

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 4 月 18 日 (18.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/31138 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, A61K 35/76, 38/00, 48/00, A61P 21/00, 25/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/08372
- (22) 国際出願日: 2001 年 9 月 26 日 (26.09.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-308533 2000 年 10 月 6 日 (06.10.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福村正之 (HUKUMURA, Masayuki) [JP/JP]; 長谷川 護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki (JP). 塩谷彰浩 (SHIOTANI, Akihiro) [JP/JP]; 〒112-0006 東京都文京区小日向1-7-8-201 Tokyo (JP). 前田光代 (MAEDA, Mitsuyo) [JP/JP]; 〒591-8035 大阪府堺市東上野芝町2丁目305-9 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 02/31138 A1

(54) Title: PARAMYXOVIRUS VECTOR FOR TRANSFERRING FOREIGN GENE INTO SKELETAL MUSCLE

(54) 発明の名称: 骨格筋に外来遺伝子を導入するためのパラミクソウイルスベクター

(57) Abstract: It is examined whether or not a recombinant Sendai virus (SeV) vector is usable in transporting a gene into a skeletal muscle by using LacZ reporter gene and insulin-like growth factor gene. As a result, the transgene expression is sustained for 1 month at the longest after the injection. Compared with a control, the transfer of the insulin-like growth factor gene causes a significant increase in regenerated fibers and a significant increase in slipped muscle fibers, i.e., an indication of enlargement. Also, the total muscle fiber number is increased thereby. Thus, it is indicated that the paramyxovirus vector containing Sendai virus achieves the high-level expression of the transgene in the skeletal muscle and that the transfer of the insulin-like growth factor gene with the use of the paramyxovirus vector is seemingly highly useful in treating neuromuscular disorders.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY



(57) 要約:

骨格筋への遺伝子輸送のため、組換えセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いることが可能であるか否かを、LacZ レポーター遺伝子及びインスリン様増殖因子遺伝子を利用して検討した。その結果、トランスジーン発現は注射後最大1ヶ月間持続した。インスリン様増殖因子遺伝子の導入は、対照と比較して、再生筋繊維の有意な増加、及び肥大の指標である分裂筋繊維の有意な増加を示し、さらに筋繊維総数の増加も示した。センダイウイルスを含むパラミクソウイルスベクターが、骨格筋において高レベルのトランスジーン発現を達成すること、及びパラミクソウイルスベクターを用いたインスリン様増殖因子遺伝子の導入が、神経筋障害の治療における大きな可能性を有していることが示された。

明細書

骨格筋に外来遺伝子を導入するためのパラミクソウイルスベクター

技術分野

本発明は、骨格筋へ外来遺伝子を導入するためのパラミクソウイルスベクターに関する。

背景技術

パラミクソウイルス亜科 (Paramyxovirinae) には、ラブドウイルス (Rhabdoviridae)、パラミクソウイルス (Paramyxoviridae)、及びフィロウイルス (Filoviridae) という3種の属が含まれる。これらは、mRNA 合成、及びアンチ鎖ゲノムの合成のための鋳型として機能する非分節型 (-) 鎖 RNA ゲノムを有する、エンベロープをもつウイルスである。センダイウイルス (SeV) は、パラミクソウイルス属に属し、ウイルス学における初期の研究から、このヒト病原性は否定されている (ウイルス実験プロトコル 永井美之、石浜明、1995. 4)。SeV は、哺乳動物細胞において厳密な細胞質生活環を有し、導入された RNA は宿主細胞の染色体と相互作用することなく細胞質状態で維持されるため、SeV はヒト遺伝子治療のために安全に使用されうる。ここで用いられる SeV Z 株の全長ゲノム・ヌクレオチド配列は、1986 年に Shibuta らにより決定された。さらに、形質転換された SeV cDNA から感染ウイルスを回収することが成功したため、遺伝子操作が可能となった (Conzelmann, K. K. Annu. Rev. Genet. 32, 123-162 (1998); Y. Nagai, A. Kato Microbiol. Immunol. 43, 613-624 (1999))。さらに、付加的な転写ユニットを有する多様な外来遺伝子が、適当なゲノム位置に挿入され、極めて高レベルに SeV において発現されている (Yu, D., T. Shioda, A. Kato, M. K. Hasan, Y. Sakai and Y. Nagai Genes Cells 2, 457-466 (1997))。

インスリン様増殖因子 (IGF-I) は、骨格筋の発達、維持、及び再生において重要な役割を果たす。筋原細胞に対する IGF-I の効果には、筋芽細胞複製、筋原分化、及び筋管肥大の刺激が含まれる (Annu.Rev.Physiol., 53, 201-216(1991)、Endocr.Rev., 17, 481-516(1996)、Cell., 75, 59-72(1993)、Genes Dev., 7, 2609-2617(1993))。筋肉再生には、筋肉前駆細胞の増殖、筋管への融合、及び再神経支配が含まれる。衛星細胞において産生される IGF-I は、筋肉前駆細胞の増殖及び分化のための強力な刺激因子として作用する (Acta Physiol Scand, 167, 301-305(1999))。骨格筋への IGF-I 遺伝子導入は、既に、非ウイルス技術を用いた、除神経骨格筋萎縮の治療、AAV ベクターを用いた、加齢に関連した骨格筋機能消失の治療に応用されている (Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 95, 15603-15607(1998))。

発明の開示

本発明は、高い効率で骨格筋へ外来遺伝子を導入できるパラミクソウイルスベクターおよびその用途を提供することを課題とする。より詳しくは、本発明は、骨格筋へ外来遺伝子を導入するために用いるパラミクソウイルスベクター、該ベクターを含む骨格筋への外来遺伝子導入用組成物、および該ベクターを利用して骨格筋へ外来遺伝子を導入する方法を提供する。本発明の好ましい態様において、インスリン様増殖因子をコードする遺伝子が挿入されたパラミクソウイルスベクターおよび筋繊維形成のためのその利用を提供する。

骨格筋は、全身性疾患及び神経筋障害の治療のための治療用タンパク質をコードする外因性遺伝子の、輸送及び発現のための魅力的な部位である。本発明者等は、骨格筋への遺伝子輸送のため、LacZ レポーター遺伝子及びヒト・インスリン様増殖因子 (hIGF-I) 遺伝子を含有する組換えセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いることが可能であるか否かを検討した。

LacZ/SeV の筋肉内注射の 7 日後、ブピバカイン処理動物／未処理動物において、多数の X-gal 標識筋繊維が認められ、トランスジーン発現は注射後最大 1 ヶ

3

月間持続した。L6 細胞の培養上清中に、主要なタンパク質種として、IGF-I/SeV に由来する組換え hIGF-I が検出され、従って、誘導された L6 細胞は、多核組織及び肥大のような形態学的変化を受けていた。筋肉への IGF-I/SeV の導入は、La cZ/SeV 処理対照と比較して、再生筋繊維の有意な増加、及び肥大の指標である分裂筋繊維の有意な増加を示し、さらに筋繊維総数の増加も示した。これらの結果より、センダイウイルスを含むパラミクソウイルスベクターが、骨格筋において高レベルのトランスジーン発現を達成すること、及びパラミクソウイルスベクターを用いた IGF-I 遺伝子導入が、神経筋障害の治療における大きな可能性を有していることが示された。

即ち、本発明は、骨格筋へ外来遺伝子を導入するためのパラミクソウイルスベクターおよびそれを用いた外来遺伝子の骨格筋への導入方法、並びに外来遺伝子としてインスリン様増殖因子が挿入されたパラミクソウイルスベクターおよびその筋繊維の形成のための利用に関し、より具体的には、

〔1〕 外来遺伝子が挿入されたパラミクソウイルスベクターを骨格筋に投与することを含む、外来遺伝子を骨格筋に導入する方法、

〔2〕 パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〔1〕に記載の方法、

〔3〕 外来遺伝子が治療用遺伝子である、〔1〕または〔2〕に記載の方法、

〔4〕 外来遺伝子がインスリン様増殖因子をコードする遺伝子である、〔1〕または〔2〕に記載の方法、

〔5〕 骨格筋に外来遺伝子を導入するために用いる、外来遺伝子が挿入されたパラミクソウイルスベクター、

〔6〕 パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〔5〕に記載のベクター、

〔7〕 外来遺伝子が治療用遺伝子である、〔5〕または〔6〕に記載のベクター、

〔８〕 外来遺伝子がインスリン様増殖因子をコードする遺伝子である、〔５〕または〔６〕に記載のベクター、

〔９〕 外来遺伝子が挿入されたパラミクソウイルスベクターを含む、骨格筋に外来遺伝子を導入するための組成物、

〔１０〕 パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〔９〕に記載の組成物、

〔１１〕 外来遺伝子が治療用遺伝子である、〔９〕または〔１０〕に記載の組成物、

〔１２〕 外来遺伝子がインスリン様増殖因子をコードする遺伝子である、〔９〕または〔１０〕に記載の組成物、

〔１３〕 哺乳動物において再生筋繊維および／または分裂筋繊維を増加させるために用いられる、〔１２〕に記載の組成物、

〔１４〕 神経筋障害の治療に用いられる、〔１２〕に記載の組成物、を提供するものである。

なお、本発明において「パラミクソウイルスベクター」とは、パラミクソウイルスに由来し遺伝子を宿主細胞に導入するベクター（担体）を指す。本発明のパラミクソウイルスベクターはリボ核タンパク質（RNP）であってもよく、また、感染力を持つウイルス粒子であってもよい。ここで「感染力」とは、組換えパラミクソウイルスベクターが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、接着した細胞の内部にベクター内部の遺伝子を導入することのできる能力のことを言う。好ましい態様では、本発明のパラミクソウイルスベクターは、外来遺伝子を発現することができるように該遺伝子が遺伝子工学的に組み込まれている。本発明のパラミクソウイルスベクターは、複製能を有していてもよく、複製能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「複製能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

本明細書において、「組換え」パラミクソウイルスベクターとは、遺伝子操作により構築されたパラミクソウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるパラミクソウイルスベクターを言う。組換えパラミクソウイルスベクターは、例えば、組換えパラミクソウイルス cDNA から再構成して生成することができる(Y. Nagai, A. Kato, Microbiol. Immunol., 43, 613-624 (1999))。

本発明においてパラミクソウイルスとはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科の(Paramyxoviridae)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RS ウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス 1,2,3 型等が挙げられる。本発明のウイルスは、好ましくはパラミクソウイルス属 (Paramyxovirus) に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なパラミクソウイルス属ウイルスとしては、例えばセンダイウイルス(Sendai virus)およびヒト HA2 などを含むパラインフルエンザウイルス 1 型、サル SV5 および SV41 並びにヒト CA などを含むパラインフルエンザウイルス 2 型、ウシ SF およびヒト HA1 などを含むパラインフルエンザ 3 型、パラインフルエンザ 4 型 (A 亜型および B 亜型を含む)、ムンプスウイルス、ニューカッスルウイルス、並びにその他の多くのパラミクソウイルス属ウイルスが含まれる。本発明のパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI 粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) 等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、本発明のウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

パラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が含まれる。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP 遺伝子は「N 遺伝子」と表記されることもある。

パラミクソウイルス属 NP P/C/V M F HN - L

ルブラウイルス属 NP P/V M F HN (SH) L

モービリウイルス属 NP P/C/V M F H - L

例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のレスピロウイルス (Respirovirus) に分類されるセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP 遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P 遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M 遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F 遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN 遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L 遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886 を参照のこと。

本発明において「遺伝子」とは遺伝物質を指し、RNA および DNA 等の核酸が含まれる。遺伝子は蛋白質をコードしてもよく、また蛋白質をコードしていなくてもよい。遺伝子はリボザイムまたはアンチセンス RNA などの機能的 RNA をコードするものであってもよい。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖 DNA および二本鎖 DNA を含む。

本発明において「骨格筋」とは、横紋像を呈する筋肉を指し、本明細書においては心筋を含む。

本発明は、パラミクソウイルスベクターの骨格筋へ遺伝子導入用途を提供する。本発明者等は、パラミクソウイルスの一つであるセンダイウイルスが極めて高い効率で骨格筋へ遺伝子を導入することができることを見出した。骨格筋は、全身性疾患及び神経筋障害を治療するための標的として重要であり、本発明のベクターはこれら疾患の遺伝子治療に好適に用いられ得る。

また、本発明者等により、組換えセンダイウイルスベクターを利用して骨格筋に導入された遺伝子が1箇月にわたり持続的な発現を示すことが示された。このことは、組換えセンダイウイルスベクターを利用して骨格筋を標的とした遺伝子治療を行った場合に、持続的な治療効果を得ることができるという利点をもたらす。

また、安全性の面においてもヒト病原性が否定されているため、パラミクソウイルスベクターはヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられうることが示唆される。第一に、プラスミドDNAによる外来遺伝子の発現は、導入したDNAの核局在化又は核膜の消失が必要であることが、遺伝子発現の成功率を低下させる主要な障害になっている。しかし、例えばセンダイウイルスなどの場合、外来遺伝子の発現は、細胞質内において細胞性チューブリンおよび自身が持つRNAポリメラーゼ(L 蛋白質)の両方によってウイルスゲノムの複製に伴って駆動される。これはまた、センダイウイルスが宿主の染色体と相互作用しないことを示しており、染色体異常による細胞の癌化および不死化などの安全面における問題が生じないと考えられる。第二に、センダイウイルスは齧歯類にとっては病原性で肺炎を生じることが知られているが、人に対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト霊長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている(Hurwitz, J.L. et al., Vaccine 15: 533-540, 1997)。センダイウイルスのこれらの特徴は、セ

ンダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用しうることを示唆し、センダイウイルスベクターが、骨格筋への遺伝子治療の有望な選択肢の一つとなることを結論づけるものである。

このようにパラミクソウイルスベクターが骨格筋への遺伝子導入において有効であるという本発明により得られた知見は、特に、骨格筋を標的とした遺伝子治療などにおいて大きな進歩をもたらす可能性を示している。

本発明において骨格筋への遺伝子導入に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、特に制限はない。好適なパラミクソウイルスベクターとして、例えば、複製能を有し、自立的に増殖するようなベクターが挙げられる。例えば、一般に天然型パラミクソウイルスのゲノムは、3'の短いリーダー領域に続き、N（ヌクレオキャプシド）、P（ホスホ）、M（マトリックス）、F（フュージョン）、HN（ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ）、およびL（ラージ）蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。これと同様の構造を有するゲノムを設計することにより、自律複製可能な本発明のベクターを製造することができる。また、ゲノム内に外来遺伝子を挿入することにより、外来遺伝子を発現するベクターを製造することができる。なお、本発明のパラミクソウイルスベクターにおいては、ウイルス遺伝子の配置は野生型ウイルスから改変されていてもよい。

また、本発明に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、野生型パラミクソウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってもよい。例えば、センダイウイルスベクターを再構成させる場合、NP、P/CおよびL遺伝子から作られる蛋白質群がトランスに必要だと考えられているが、該蛋白質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要はない。例えば、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する発現ベクターを、ベクターゲノムをコードする発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、再構成を行うことができる。また、該蛋白質群をコードする遺伝子を有す

る宿主細胞にベクターゲノムをコードする発現ベクターを導入し、該宿主細胞から該蛋白質群を供給して再構成を行ってもよい。これらの蛋白質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでもなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、パラミクソウイルスベクターが細胞に伝播してゆくためには、M、F および HN 遺伝子から作られる蛋白質群が必要だと考えられているが、パラミクソウイルスベクターを RNP として調製する場合は、これらの蛋白質は必要ない。RNP に含まれるゲノムに、M、F および HN 遺伝子が含まれていれば、宿主に導入された時に、これらの遺伝子産物が生産され、感染性のあるウイルス粒子が形成される。

RNP を細胞に導入するには、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。複製型ウイルスの場合、産生されたウイルスは、培養細胞、鶏卵、個体 (例えばマウスなどの哺乳動物) などに再感染させて増幅または継代することができる。

逆に、M、F および/または HN 遺伝子が含まれていないパラミクソウイルスベクターも、本発明のパラミクソウイルスベクターとして用いることができる。このようなウイルスベクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスベクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはこれらのいずれかの遺伝子を欠損しているため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、

一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えば F 遺伝子および／または HN 遺伝子が挙げられる。例えば、F 遺伝子が欠損した組換えパラミクソウイルスベクターゲノムを発現するプラスミドを、F 蛋白質の発現ベクターならびに NP、P/C および L 蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ウイルスベクターの再構成を行うことができる（国際出願番号 PCT/JP00/03194 および PCT/JP00/03195）。また、例えば、F 遺伝子が染色体に組込まれた宿主細胞を用いて製造することもできる。これらの蛋白質群を外から供給する場合、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をベクターのエンベロープに含むベクターを作製することもできる。このようなタンパク質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベロープタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス（VSV）の G タンパク質（VSV-G）を挙げることができる。本発明のパラミクソウイルスベクターは、VSV-G タンパク質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープタンパク質を含むシュードタイプウイルスベクターが含まれる。

また、本発明のパラミクソウイルスベクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラタンパク質などを含むものであってもよい。これにより、特定の組織を標的とするベクターを作り出すこともできる。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構成時に、ゲノム以外の遺伝子（例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体などの遺伝子）の発現により供給されてもよい。

また、本発明のウイルスベクターは、例えば、免疫原性を低下させるために、または、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれるウイルス遺伝子が改変されたものであってもよい。具体的には、例えば複製因子であるNP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、膜融合リボソームの融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用して抗原提示能を弱めたパラミクソウイルスを作製することもできる。

本発明のウイルスベクターは、ゲノムRNA中に外来遺伝子をコードし得る。外来遺伝子を含む組換えパラミクソウイルスベクターは、上記のパラミクソウイルスベクターゲノムに外来遺伝子を挿入することによって得られる。外来遺伝子としては、標的とする骨格筋において発現させたい所望の遺伝子を用いることができる。外来遺伝子は天然型蛋白質をコードする遺伝子であってもよく、また天然型蛋白質と同等の機能を有する蛋白質をコードする限り、欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子であってもよい。例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、該ウイルスベクターDNAに対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入する。ウイルスベクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウイルスベクターDNAにおいては、転写終結(E)配列と転写開始(S)配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい (Journal of Virology, Vol.67, No.8, 1993, p.4822-4830)。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子 (NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子) の前

12

および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜 E-I-S 配列（転写開始配列－介在配列－転写終結配列）またはその部分を挿入する。あるいは、IRES を介して外来遺伝子を挿入することもできる。挿入した外来性遺伝子の発現量は、外来遺伝子の upstream に付加する転写開始配列の種類により調節することができる。また、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後の塩基配列により調節する。例えば、センドライウイルスにおいては、挿入位置がウイルスゲノムのネガティブ鎖 RNA の 3' 端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP 遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が高い。外来遺伝子の高い発現を得るためには、外来遺伝子を NP 遺伝子の upstream（マイナス鎖においては 3' 側）または NP 遺伝子と P 遺伝子の間など、ネガティブ鎖ゲノムにおいて upstream 領域に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖 RNA の 5' 端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L 遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も 5' 側、すなわち野生型ウイルスゲノムにおいては L 遺伝子の downstream（ネガティブ鎖においては L 遺伝子の 5' 隣接部位）、または L 遺伝子の upstream（ネガティブ鎖においては L 遺伝子の 3' 隣接部位）に外来遺伝子を挿入する。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルスタンパク質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。ゲノムをコードするベクター DNA 中の当該制限酵素部位に外来遺伝子断片を挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、本発明のベクターは、このように挿入した以外に位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。

13

外来遺伝子を有する組換えセンダイウイルスベクターは、例えば、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466 の記載に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、所望の外来遺伝子の cDNA 塩基配列を含む DNA 試料を用意する。DNA 試料は、25ng/ μ l 以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子を NotI 部位を利用してウイルスゲノムをコードする DNA に挿入する場合を例にとって説明する。目的とする cDNA 塩基配列の中に NotI 認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI 部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から所望の遺伝子断片を PCR により増幅回収する。増幅された断片の両端が NotI 部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列 (E)、介在配列 (I) 及び転写開始配列 (S) (EIS 配列) のコピーを付加するために、NotI 制限酵素切断部位配列及び転写終結配列 (E)、介在配列 (I) 及び転写開始配列 (S) と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側合成 DNA 配列及びリバーズ側合成 DNA 配列(アンチセンス鎖)を作成する。

例えば、フォワード側合成 DNA 配列は、NotI による切断を保証するために 5' 側に任意の 2 以上のヌクレオチド (好ましくは GCG、および GCC などの NotI 認識部位由来の配列が含まれない 4 塩基、更に好ましくは ACTT) を選択し、その 3' 側に NotI 認識部位 gcggccgc を付加し、さらにその 3' 側にスペーサー配列として任意の 9 塩基または 9 に 6 の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその 3' 側に所望の cDNA の開始コドン ATG からこれを含めて ORF の約 25 塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基は G または C となるように該所望の cDNA から約 25 塩基を選択してフォワード側合成オリゴ DNA の 3' の末端とすることが好ましい。

リバース側合成 DNA 配列は 5' 側から任意の 2 以上のヌクレオチド（好ましくは GCG、および GCC などの NotI 認識部位由来の配列が含まれない 4 塩基、更に好ましくは ACTT）を選択し、その 3' 側に NotI 認識部位 gcggccgc を付加し、さらにその 3' 側に長さを調節するための挿入断片のオリゴ DNA を付加する。このオリゴ DNA の長さは、NotI 認識部位 gcggccgc を含め、cDNA の相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムの EIS 塩基配列の合計が 6 の倍数になるように塩基数を設計する（いわゆる「6 のルール (rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998）。さらに挿入断片の 3' 側にセンダイウイルスの S 配列の相補鎖配列、好ましくは 5'-CTTCA CCCT-3'、I 配列、好ましくは 5'-AAG-3'、E 配列の相補鎖配列、好ましくは 5'-TTTTTCTTACTACGG-3'、さらにその 3' 側に所望の cDNA 配列の終始コドンから逆に数えて約 25 塩基相当の相補鎖の最後の塩基が G または C になるように長さを選択して配列を付加し、リバース側合成オリゴ DNA の 3' の末端とする。

PCR は、例えば、ExTaq ポリメラーゼ（宝酒造）を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくは Vent ポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片は NotI で消化した後、プラスミドベクター pBluescript の NotI 部位に挿入する。得られた PCR 産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片を NotI で切り出し、ゲノム cDNA を含むプラスミドの NotI 部位にクローニングする。またプラスミドベクター pBluescript を介さずに NotI 部位に直接挿入し、組換えセンダイウイルス cDNA を得ることも可能である。

ウイルスゲノムをコードする DNA は、適当な転写プロモーターを連結してベクター DNA を構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、ウイルスの L、P、および NP タンパク質の共存下で RNP を再構成させ、この RNP を含むウイルスベクターを生成させることができる。ウイルスベクター DNA からのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる（国際公開 97/16539 号；国際公開 97

/16538 号; Durbin, A.P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S.P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M.J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M.D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R.M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーベストウイルス、センダイウイルスなどを含むパラミクソウイルスベクターを DNA から再構成させることができる。ウイルスベクターDNA において、F 遺伝子、HN 遺伝子、および/または M 遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることが可能である。

例えば、ベクターDNA を細胞内に導入する方法には、次のような方法、①目的の細胞が取り込めるような DNA 沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つ DNA を含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA 分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入った DNA は貪食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量の DNA が入ることが知られている (Graham, F.L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and

d Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。Chen および Okayama はトランスファ技術の最適化を検討し、1) 細胞を共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO₂、35°C、15~24 時間、2) DNA は直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中の DNA 濃度が 20~30 µg/ml のとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くは DEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5×10^5) 混液を所望の DNA 濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界 (電極間のギャップ、電圧) の強さ、バッファの導電率、DNA 濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、本発明においては、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169) が用いられる。

cDNA からの再構成は具体的には次のようにして行うことができる。

24 穴から 6 穴程度のプラスチックプレートまたは 100mm ペトリ皿上で、10% ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質 (100 units/ml ペニシリン G および 100 µg/ml ストレプトマイシン) を含む最少必須培地 (MEM) を用いてサル腎臓由来細胞株 LLC-MK2 を 70~80%コンフルエントになるまで培養し、例えば 1 µg/ml psoralen (ソラレン) 存在下 UV 照射処理を 20 分処理で不活化した、T7 ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルス vTF7-3 (Fuerst, T.R. et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) を 2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量および UV 照射時間を適宜調整することができる。感染 1 時間後、2~60 μ g、より好ましくは 3~5 μ g の上記の組換えセンダイウイルス cDNA を、全長センダイウイルスゲノムの生成に必須なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド (24-0.5 μ g の pGEM-N、12-0.25 μ g の pGEM-P、および 24-0.5 μ g の pGEM-L、より好ましくは例えば 1 μ g の pGEM-N、0.5 μ g の pGEM-P、および 1 μ g の pGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) と共に Superfect (QIAGEN 社) を用いたりポフェクション法等によりトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、所望により 100 μ g/ml のリファンピシン (Sigma) 及びシトシンアラビノシド (AraC)、より好ましくは 40 μ g/ml のシトシンアラビノシド (AraC) (Sigma) のみを含む血清不含の MEM で培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから 48~72 時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を 3 回繰り返して細胞を破碎した後、LLC-MK2 細胞にトランスフェクションして培養する。培養 3~7 日後に培養液を回収する。エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損した複製能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープタンパク質を発現する LLC-MK2 細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープタンパク質を発現する LLC-MK2 細胞に重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる (国際出願番号 PCT/JP00/03194 および PCT/JP00/03195 参照)。培養上清に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性 (HA) を測定することにより決定することができる。HA は「endo-point 希釈法」

(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579) により決定することができる。得られたウイルスストックは-80℃で保存することができる。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、LLCMK2 細胞、サル腎由来の CV-1 細胞、ハムスター腎由来の BHK 細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコル III, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172）。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ 9~12 日間 37~38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを漿尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ漿尿液を回収する。漿尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代真人, 「ウイルス実験プロトコル」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp.68-73, (1995)）。

欠損型ウイルスベクターを調製する場合、例えば、ゲノム上で欠損しているエンベロープ遺伝子が異なる 2 種のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するエンベロープタンパク質が、もう一方の複合体からの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2 種またはそれ以上の本発明のベクターを、エンベロープタンパク質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのエンベロープ遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、エンベロープ遺伝子が欠損しているため、エンベロープ遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなり長い外来遺伝子を保持することができる。また、元々感染性

のないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

外来遺伝子として疾患の治療用遺伝子を用いてウイルスベクターを調製すれば、このベクターを投与して遺伝子治療を行うことが可能となる。本発明のウイルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接投与による遺伝子発現、間接 (*ex vivo*) 投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子等を発現させることが可能である。外来遺伝子としては特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸に加え、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。

本発明のパラミクソウイルスベクターは、薬学的に許容される所望の媒体と共に組成物とすることができる。「薬学的に許容される担体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を阻害しない材料である。例えば本発明のパラミクソウイルスベクターを生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などで適宜希釈して組成物とすることができる。本発明のパラミクソウイルスベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては漿尿液を含んでよい。また本発明のパラミクソウイルスベクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の媒体を含んでいてもよい。さらに、その他にも、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。

上記のようにして得られたパラミクソウイルスベクターまたは該ベクターを含む組成物を骨格筋へ導入することで、パラミクソウイルスベクターが持つ外来遺伝子を骨格筋で発現させることができる。

さらに、ウイルスベクターの投与前に、筋肉の再製を誘発することによりトランスジーンの発現を増強することが知られているブピバカインを投与してもよい。

本発明のパラミクソウイルスにより導入する遺伝子としては、特に制限はないが、天然の蛋白質としては、例えばホルモン、サイトカイン、増殖因子、受容体、

20

酵素、ペプチドなどが挙げられる。蛋白質は分泌蛋白質、膜蛋白質、細胞質蛋白質、核蛋白質などであり得る。人工的な蛋白質としては、例えば、キメラ毒素などの融合蛋白質、ドミナントネガティブ蛋白質（受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む）、欠失型の細胞接着分子および細胞表面分子などが挙げられる。また、分泌シグナルや膜局在化シグナル、核移行シグナル等を付加した蛋白質であってもよい。導入遺伝子は、骨格筋の細胞で発現していない遺伝子であってもよく、また骨格筋の細胞で発現している遺伝子を導入し、発現を増大させてもよい。また、アンチセンス RNA 分子または RNA 切断型リボザイムなどを発現させて骨格筋の細胞で発現する望ましくない遺伝子の機能を抑制することもできる。

本発明のベクターは、様々な疾患に対する遺伝子治療に適用することが期待される。このような遺伝子治療には、例えば、遺伝子欠損による細胞での発現の異常を補正するために、また、外来遺伝子を細胞に導入することにより新しい機能を付加させるために、あるいは、ある遺伝子に対して抑制的に働く遺伝子を導入することにより細胞における望ましくない作用を抑制するために行い得る。

遺伝子治療の対象となる疾患としては、例えば、筋ジストロフィー、筋炎、ミオパチー、並びに心筋梗塞後のミオパチー及び心筋症が挙げられる。筋ジストロフィーの治療に有効な遺伝子としては、例えば、ジストロフィンや IGF-I が、筋炎の治療に有効な遺伝子としては、例えば、IGF-I や FGF が、ミオパチーの治療に有効な遺伝子としては、例えば、IL-10、IL-12 や IL-6 が挙げられる。

本発明のパラミクソウイルスにより導入する遺伝子の好適な一例として、インスリン様増殖因子をコードする遺伝子が挙げられる。これにより再生筋繊維の有意な増加、及び肥大の指標である分裂筋繊維の有意な増加、さらに筋繊維総数の増加が期待できる。従って、インスリン様増殖因子をコードする遺伝子が導入されたパラミクソウイルスは、神経筋障害の治療への応用が期待される。神経筋障

21

害としては、例えば、外傷による神経繊維切断、筋萎縮性側索硬化症、脊髄性筋萎縮症を例示することができる。

遺伝子治療は、骨格筋の内または外から、パラミクソウイルスベクター含有組成物を *in vivo* で投与し、外来遺伝子を骨格筋の細胞内で発現させることにより実施することができる。また、*ex vivo* による投与を行ってもよい。骨格筋へのベクターの導入は、例えば、経皮的に導入する方法や開皮して直接導入する方法が挙げられる。ベクターの導入の際には、筋上膜を破損しないように処置することに留意する必要がある。

骨格筋へのパラミクソウイルスベクターは、有効量のベクターが骨格筋の細胞に導入されるのに十分な量を投与される。「有効量」とは、本発明に方法において、所望の治療または予防効果を少なくとも部分的にもたらすように骨格筋の細胞に遺伝子が導入される量を言う。所望の遺伝子を含む本発明のパラミクソウイルスベクターの有効量が投与されることにより、ベクターが導入された細胞および/またはその周囲の細胞の表現型の変化が誘導される。好ましくは、所望の遺伝子を有する本発明のベクターの有効量が投与されることにより、投与された骨格筋中の有意な数の細胞に遺伝子が導入され、該細胞の表現型の変化が誘導される。「有意な数の細胞」とは、本発明のベクターが、投与部位における標的骨格筋細胞の少なくとも約 0.1%、好ましくは約 1% 以上、より好ましくは約 5% 以上、より好ましくは約 10% 以上、最も好ましくは約 20% 以上の細胞で遺伝子が導入されることを言う。

細胞への遺伝子導入は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNA プロテクションアッセイ等により検出することができる。ノーザンハイブリダイゼーションや RT-PCR 等による検出は *in situ* でも行い得る。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンブロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。また、遺伝子導入の検出を容易

2 2

にするため、発現させる蛋白質にタグを付加したり、レポーター遺伝子を発現するように組み込んでおくことも可能である。レポーター遺伝子は、 β ガラクトシダーゼ、CAT、アルカリホスファターゼ、または GFP をコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに制限されない。

ベクターの投与量、並びに投与経路は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。好ましくは、投与するベクター濃度は約 10^5 pfu/ml から約 10^{11} pfu/ml の範囲内であるとよい。より好ましくは、投与するベクターの濃度は約 10^7 pfu/ml から約 10^9 pfu/ml の範囲内であるとよい。最も好ましくは、約 1×10^8 pfu/ml から約 1×10^9 pfu/ml の範囲内の濃度を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。

本発明のウイルス含有組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

図面の簡単な説明

図 1 は、*in vitro* の hIGF-I 発現を示す写真および図である。(A) ウイルス感染 L6 細胞の培養上清中の hIGF-I の発現を示す写真。括弧内に記載された条件下での培養上清からの試料を、ウェスタンブロットで分析した (1=ウイルスなし、2=LacZ/SeV (moi=0.1、3 日間)、3=IGF-I/SeV (moi=0.1、3 日間)、4=IGF-I/SeV (moi=0.1、4 日間))。(B) hIGF-I/SeV 感染 L6 細胞に由来する hIGF-I の時間及び moi に依存的な発現を示すグラフ。異なる moi で感染した細胞由来の上清を、異なる時間に採取し、ELISA キットを用いて hIGF-I 量をアッセイした。

図 2 は、SeV 媒介 hIGF-I は、L6 細胞の筋原分化及び肥大を増強することを示す写真である。

23

無血清培地（分化培地）で4日間培養された対照細胞。ウイルス感染細胞は、 $\text{moi}=0.05$ 又は 0.2 のいずれかで行われ、無血清培地で4日間培養された。固定後、筋管をミオシンH鎖胚サブユニットに対するモノクローナル抗体（MAb BF-45）で処理し、その他の細胞を核染色にかけた。ウイルス感染細胞は、 $\text{moi}=0.05$ では中程度の筋管肥大を示し、 $\text{moi}=0.2$ では、血清除去のみの条件で培養された場合よりも、はるかに明確な筋管肥大を示す。ウイルス感染細胞には核組織が認められ、筋繊維の中央に集合していた。

図3は、*in vivo*の骨格筋へのSeVの形質導入可能性を示す写真である。

筋壊死剤（ブピバカイン）による前処理の有／無の条件下で、成熟ラットの前脛骨筋に、LacZ レポーター遺伝子を含む組換え SeV ($5 \times 10^7 \text{pfu}$) (LacZ/SeV) を $200 \mu\text{l}$ 注射した。以下のような日数の後、筋肉を切開し、 β -ガラクトシダーゼ活性について染色した。A 及び B：ブピバカイン（7日）、C 及び D：ブピバカイン（14日）、E 及び F：ブピバカイン（30日）、G 及び H：ブピバカインなし（7日）、I 及び J：ブピバカインなし（14日）、K 及び L：ブピバカインなし（30日）。

図4は、ウイルス注射の7日後の前脛骨筋におけるhIGF-I発現を示す写真である。抗hIGF-I抗体によるウェスタンブロッティング解析。LacZ/SeV ($2 \times 10^8 \text{pfu}$) 又は hIGF-I/SeV ($2 \times 10^8 \text{pfu}$) のいずれかをそれぞれ $200 \mu\text{l}$ 、前脛骨筋に注射した。7日後、切開された凍結筋組織 $100 \mu\text{g}$ から、 $300 \mu\text{l}$ の組織抽出溶液を得た。 $50 \mu\text{l}$ ($16.7 \mu\text{g}$ 組織等量) 中のタンパク質を冷アセトンで沈殿させ、次に抗hIGF-I抗体によるウェスタンブロッティング解析にかけた。（M：マーカータンパク質、1：未処理、2：LacZ/SeV（#1動物）、3：LacZ/SeV（#2動物）、4：hIGF-I/SeV（#3動物）、5：hIGF-I/SeV（#4動物））。

図5は、ウイルス注射の7日後の前脛骨筋におけるhIGF-I発現を示す写真である。前脛骨筋の再生。LacZ/SeV ($2 \times 10^8 \text{pfu}$) 及び hIGF-I/SeV ($2 \times 10^8 \text{pfu}$) を各 $200 \mu\text{l}$ 、それぞれ右又は左の前脛骨筋に注射した。切開された筋肉の横

24

断切片を、ヘマトキシリン・エオシン (HE) (a、d、及び g)、マクロファージを検出するための酸性ホスファターゼ活性 (b、e、及び h)、及び BF-45 (c、f、及び i) で処理した。白及び黒の矢印は、それぞれマクロファージ及び BF-45 陽性細胞を示す。

図 6 は、ウイルス注射の 7 日後の前脛骨筋における hIGF-I 発現を示すグラフである。胚 MyHC を発現する筋繊維の数。胚 MyHC 陽性細胞の総数を計数し ($n=4$)、結果を平均 \pm SD として表した ($n=4$)。アステリスクは、対比較に関する $p<0.01$ を表す (スチューデント t 検定)。

図 7 は、ウイルス注射の 14 日後の前脛骨筋の再生を示す写真である。LacZ/SeV (2×10^8 pfu) 及び hIGF-I/SeV (2×10^8 pfu) を各 $200\mu\text{l}$ 、それぞれ右又は左の前脛骨筋に注射した。切開された筋肉横断切片をヘマトキシリン・エオシンで染色した。(A: 尿膜腔液のみ、B: IGF-I/SeV (左)、C: LacZ/SeV (右))。

図 8 は、ウイルス注射の 30 日後の前脛骨筋の再生を示す写真である。切片中に炎症反応はほぼ全く見られなかった。IGF-I/SeV 処理された筋肉は、肥大による分裂現象を示した (図 8a 及び b)。分裂の位置は、矢印により示されている。LacZ/SeV で処理された再生筋繊維は、ほぼ正常に回復した (図 8c)。

図 9 は、ウイルス注射の 30 日後の前脛骨筋の再生を示すグラフである。筋繊維数 (白カラム) 及び分裂繊維数 (黒カラム) に対する hIGF-I 発現の効果。グループ 1 の各動物の LacZ/SeV 処理前脛骨筋の繊維総数を、hIGF-I/SeV 処理に対する対照とした (値を 1 と定義) (対照の値に対する相対値で表されている)

(白カラム)。相対値の平均 ($n=4$) をプロットした (\pm SD)。単一のアステリスクは対比較に関する $P<0.03$ を表す (スチューデント t 検定)。分裂繊維を計数し、結果を平均 \pm SD ($n=4$) で表した。二重のアステリスクは対比較に関する $P<0.01$ を表す (スチューデント t 検定)。

図 10 は、マウス足筋肉における遺伝子導入の比較 (3 日後) を示す図である。タイターは、 4×10^7 CIU/head (用量 $100\mu\text{l}$ 、回数 2 回) を表す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] センダイウイルスベクターの構築

受託番号 X00173 の DNA 配列に基づくプライマー 5'-ATCCGAATTCGCAATGGGAAAAATCAGCAGTC-3' (配列番号: 1) 及び 5'-ATCCGAATTCCTACATCCTGTAGTTCTTGTTCCTGC-3' (配列番号: 2) を用いた PCR により、ヒト cDNA ライブラリー (Gibco BRL, Rockville, MD) から、ヒト IGF-I オープン・リーディング・フレームを増幅した (Nature, 306, 609-611(1983))。得られた PCR 産物を pBluescript II の EcoRI 部位にクローニングし、次に配列決定した。hIGF-I 遺伝子の正確な配列を有する産物を、SeV 特異的転写制御シグナル配列を含有するプライマー 5'-ATCCGCGGC CGCCAAAGTTCAGCAATGGGAAAAATCAGCAGTCTTC-3' (配列番号: 3) 及び 5'-ATCCGCGG CCGCGATGAAGTTTACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCTACATCCTGTAGTTCTTGTTCCTGC-3' (配列番号: 4) を用いて再増幅し、15402 ヌクレオチドの正確な SeV 全長アンチゲノム(+)センス RNA を作製するため構築された親 pSeV18+b(+)の NotI 部位にクローニングし、pIGF-I/SeV を得た。得られた pIGF-I/SeV を、T7 ポリメラーゼを発現するワクシニアウイルス vTF7-3 に感染した LLCMK2 細胞に形質転換した。T7 により制御される全長組換え IGF-I/SeV RNA ゲノムを、共形質転換された各プラスミドから乾燥させた N タンパク質、P タンパク質、及び L タンパク質でカプセル化した。40 時間のインキュベーションの後、回収されたウイルスを増幅するため、胚を有するニワトリ卵に形質転換された細胞を注射した。

[実施例 2] *in vitro* の hIGF-I 発現

IGF-I は、ラット細胞系 (J.Biol.Chem., 272, 6653-6662(1997)、J.Cell.Biol., 135, 431-440(1996)) 及びマウス細胞系 (J.Biol.Chem., 264, 13810-13817(1989)) の両方において、増殖、分化、及び肥大と密接に関連していることが示され

26

ている。本発明者らは、組換えヒト IGF-I が、SeV 媒介遺伝子導入を介して、L6 細胞（新生ラット筋芽細胞系）に対する形態学的変化を誘導することができるかを調べた。新たに構築された、組換えヒト IGF-I (hIGF-I) 遺伝子を含む Se V (hIGF-I/SeV と名付けた)、及び β -ガラクトシダーゼをコードする SeV (LacZ /SeV) を用い、以下の条件について調査した。(1) 上清中の IGF-I 発現（ウェスタンブロットティング解析）、(2) 上清中の IGF-I 発現の動態（ELISA アッセイ）、及び (3) L6 細胞における形態学的変化。

in vitro 研究

L6 細胞を、20%の FCS 及びペニシリン/ストレプトマイシンを含む DMEM 培地中で培養し、筋管細胞への分化を抑制した。無血清 DMEM 中、又は無血清下でウイルスを感染させ、細胞を分化条件下で培養した。イムノブロットティングのため、100 μ l の上清を 2 倍容量の冷アセトンで 10 μ l に濃縮し、15~25% 分解ゲルを用いたドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。次にポリビニリデンジフロリド・メンブレン (DAIICHI PURE CHEMICALS, Tokyo) に転写した。抗ヒト IGF-I モノクローナル抗体 (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX) を用いて、一次抗体反応を行い、二次反応は西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗体を用いた。増強化学発光 (ECL, Amersham, UK) を用いて複合体を可視化した。培養上清中の IGF-I レベルを測定するために ELISA アッセイを行った。方法は基本的に製造業者 (R&D systems, Minneapolis, MN) の推奨に従い実施した。

その結果、(1) 多重度 0.1、3 及び 4 日間という条件下で hIGF-I/SeV を感染させた L6 細胞培養上清中において、12~13kDa の分子量を有する反応バンドを検出した（図 1A、レーン 3 及び 4）。この分子種は LacZ/SeV 感染上清には存在せず、hIGF-I は組換え SeV から産生され、培養上清中に分泌されたことが証明された。

27

(2) 図 1B は、ウイルス感染後の L6 細胞上清中の IGF-I 発現量を示している。多重度 0.05 の感染条件下において、上清の IGF-I 濃度は、感染の 48 時間後に、細胞に対する C.P.E. を誘導することなく、203ng/ml に増加し、その後 96 時間後に 435ng/ml に増加した。0.5 の多重度では、48 時間後に 566ng/ml、96 時間後に 935ng/ml の IGF-I が培地中へ分泌された。多重度 2.5 の感染条件下では、12 時間後に 39ng/ml、24 時間後に 463ng/ml が検出された。LacZ/SeV 感染上清には IGF-I が観察されなかった。これらの結果より、SeV 媒介遺伝子導入を介して、遺伝子産物が培地上清に分泌されることが示された。

(3) L6 細胞系は、IGF-I を発現せず、その受容体を発現しているために、外因性の IGF-I に対して応答性であり、肥大の誘導をもたらすことが知られている (J. Cell. Biol. 135: 431-448 (1996))。組換え IGF-I による L6 の分化誘導能を調べた。L6 細胞を 20%FCS を含有する培地で増殖させ、80%コンフルエント時に、ウイルス媒介遺伝子導入を行い、無血清培地に置換し、あるいは、一定濃度の hIGF-I タンパク質を有する無血清培地条件下で培養した。全ての試料に、ホルモンの細胞表面への吸着を抑制するために 500 μ g/ml のウシ血清アルブミンを入れた。4 日後、ウイルス感染 m.o.i. (多重度) 依存的に、細胞形態学の明白な差異が観察された (図 2)。生じた筋管を、胚サブユニットに対するミオシン H 鎖 (MyHC) 抗体 (MAbBF45) で処理した。結合した抗体を、Alexa Flour (登録商標) 568 ヤギ抗マウス IgG (H+L) 結合体により可視化した。細胞の核を、ヨウ化プロビジウム染色により可視化した。0.05 の感染多重度の hIGF-I 濃度 (図 2A 及び E)、0.2 の感染多重度細胞 (図 2B 及び F) は、hIGF-I を含まない無血清培養下の細胞 (図 2D 及び H) よりも、大きな筋管を有し、筋繊維の中央に複数の核、及び筋管肥大、即ち筋管のサイズ及び幅の増大 (図 2A、B、E、及び F) を示した。さらに、ウイルス感染により誘導された形態学的変化は、IGF-I タンパク質により誘導された筋管と形体的に一致していた (図 2C 及び G)。これらの結果から、SeV からの組換え hIGF-I の効力が IGF-I タンパク質と一致してい

ること、組換え hIGF-I が、インビトロにおいても生物学的機能を有しており、新生ラット筋芽細胞 L6 細胞の筋生成を誘導することが示された。

〔実施例 3〕 *in vivo* の lacZ レポーター遺伝子発現

ベントバルビタールナトリウムの腹腔内注射 (50mg/kg) により、Sprague-Dawley ラット (雄、6 週齢、160~180g) を麻酔した。後肢の毛を剃り、エタノールで洗浄後、前脛骨筋を露出させるため、皮膚を 1.5cm 切開した。LacZ レポーター遺伝子導入実験のため、200 μ l の LacZ/SeV (5×10^7 pfu) を左前脛骨筋の筋腹に投与した。導入遺伝子発現は x-gal 染色により行った。プビバカイン投与は、ベクター投与 3 日前に、200 μ l の 0.5% プビバカイン溶液を前脛骨筋に投与した。

その結果、LacZ/SeV 投与の 1 週間後の残料において、プビバカイン前処理された筋肉組織は、未処理の筋肉と比較して (図 3G 及び H)、高レベルの x-gal 染色像 (図 3A 及び B) を示した。プビバカイン前処理筋肉においては、壊死繊維、好中球及びマクロファージの浸潤細胞の周辺に小さな筋繊維に x-gal 陽性像が観察された (図 3B)。小さな筋繊維は、成体ラットのの前脛骨筋におけるプビバカイン筋肉内注射及び/又はウイルス注射により誘導された、未熟な再生繊維と見なされる。Vitadello ら (Hum. Gene Ther. 5: 11-18 (1994)) は、3 日後のプビバカイン処理筋肉は、抗 MyHC モノクローナル抗体 (BF-45) に対して染色される単核細胞及び小さな筋管が見られることを示し、損傷の 1 日後又は 7 日後よりも、3 日目の方が、naked DNA 導入により発現される酵素活性の量が高いことも示している。SeV が LacZ 遺伝子を導入することができる小さい陽性繊維は、骨格筋成熟途中の細胞分裂活性を有する筋繊維又は未熟な筋管であると見なされた。非プビバカイン処理動物においては、ウイルス感染により誘導された壊死筋繊維領域は、プビバカイン及びウイルスで処理されたものよりも、はるかに小さかった。陽性繊維の数は、プビバカイン処理筋繊維よりも少なかったが、X-gal 標識筋繊維は非プビバカイン処理筋繊維にも認められた (図 3H)。形質導入された筋繊維周辺の細胞は、中心核を有しておらず、また図 3B に示された再生筋

繊維よりもサイズが大きかった。このことは、これらの細胞が成熟筋繊維であるかもしれないことを意味している。以上を考え合わせると、形質導入された筋繊維は、成熟筋繊維である可能性がある。従って、SeV は、タンパク質をコードする遺伝子を、ラット成熟筋繊維に形質導入することができた。x-gal 発現はウイルス投与の2週間後も観察された。プビバカイン処理/未処理動物における陽性繊維のプロフィールは、前記の7日後の試料と一致していたが、陽性繊維数は減少していた(図3C、D、I、及びJ)。ウイルス注射の30日後、プビバカイン処理動物においてのみ、X-gal 標識繊維が観察された(図3E 及び F)。他方、プビバカイン未処理動物においては、筋繊維には X-gal 標識繊維が観察されなかったが、間質細胞には観察された(図3K 及び L)。これらの結果より、SeV は、細胞分裂中の筋芽細胞、細胞分裂後の未熟筋管細胞のみならず成熟筋管にも感染することができた。

[実施例4] *in vivo* の IGF-I 遺伝子導入

in vitro の高レベルの hIGF-I 発現、及び *in vivo* の SeV 媒介遺伝子導入による、再生筋繊維及び成熟筋繊維への LacZ 遺伝子の導入を確認したので、次に SeV 媒介遺伝子導入によりラット骨格筋に導入された hIGF-I が、筋繊維数の増加及び筋管肥大のようなラット骨格筋の増殖を促進することができるか否かを調べた。まず、前脛骨筋における hIGF-I の発現を、ウェスタンブロッティング解析により決定した。200 μ l の尿液、 2×10^8 pfu (以前の実験よりも4倍高い pfu) の hIGF-I/SeV を含有するウイルス溶媒(200 μ l)、及び 2×10^8 pfu の LacZ/SeV を含有するウイルス溶媒(200 μ l)を、成体 Sprague-Dawley ラットの前脛骨筋に投与した。

投与1週間、2週間、及び30日間後に、致死量のペントバルビタールナトリウムにより動物を安楽死させた。前脛骨筋を切開し、組織染色及びウェスタンブロッティングに供した。ラット筋肉内のヒト IGF-I はウェスタンブロッティングにより判定した。100 μ g の筋肉組織を液体窒素中で凍結し、次に乳鉢及び乳棒

30

を用いて粉碎した。500ml の 1M 酢酸を各組織に添加し、混合物をホモジナイズし、次に 2 時間氷上に放置した。3000×g で 15 分間遠心分離した後、上清を回収した。次に沈殿物に 1M 酢酸を加え再抽出した。2 つの上清を合わせ、-70°C で凍結し、凍結乾燥させ、300 μ l の 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.8) に懸濁した。50 μ l から 10 μ l に溶液を濃縮した後、ウェスタンブロッティングに供した。

再生筋繊維の免疫組織染色は、液体窒素で冷却したイソペンタン中で、切開した前脛骨筋を迅速に凍結試料を用いた。得られた試料を 10 μ m 厚に切り、リジン・コートしたスライドに固定した。再生筋繊維の免疫組織染色は、マウス抗胚ミオシン H 鎖モノクローナル抗体 (BF-45) で一次抗体処理の後、室温にて、二次ビオチン化抗マウス IgG (1:100 ; Vector, Burlingame, CA) と共に 1 時間切片をインキュベートし、次にストレプトアビジン-ビオチン複合体 (1:200 希釈 ; Vector, Burlingame, CA) と共に 1 時間インキュベートし発色させることにより行った。0.05% の 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド及び 0.01% 過酸化水素を含有する 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.6) により、アビジン-ビオチン複合体を可視化した。その後、エオシンにより切片を対比染色した。モノクローナル抗体 BF-45 は、Dr.D.Schiaffino (Hum. Gene Ther. 5: 11-18 (1994)), Padova, Italy により開発され、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (Manassas, VA) より得た。hIGF-I による再生効果を調べるため、投与 7 日後に、抗 BF-45 免疫陽性繊維の数を調べた。さらに、hIGF-I の肥大効果を評価するため、30 日後に、筋肉の分裂繊維を計数した。

その結果、投与の 1 週間後の、IGF-I/SeV で処理前脛骨筋試料は、抗 hIGF-I 抗体に対して約 8~9kDa の分子量を有するバンドを示した。この値 (図 4、レーン 4 及び 5) は、培養上清中に観察されたものとは一致しない (図 1A)。 *in vivo* では、 *in vitro* 実験で見られた hIGF-I の前駆体をさらなるプロテアーゼ切断により、7.7kDa と報告されている成熟型 hIGF-I (Bio Science, サイトカイン増殖因子 羊土社 pp.104-105) になると考えられる。

3 1

次に、正常成熟筋肉における hIGF-I の効果を調べた。成体ラット（6 週齢）の左前脛骨筋に hIGF-I/SeV (2×10^8 pfu)、右前脛骨筋に LacZ/SeV (2×10^8 pfu) を投与し（グループ 1）、左前脛骨筋のみに hIGF-I/SeV (2×10^8 pfu) を投与するか（n=12）（グループ 2）、左前脛骨筋に LacZ/SeV (2×10^8 pfu) のみを投与、（n=12）（グループ 3）、又は尿液のみを両前脛骨筋に投与した（n=3）（グループ 4）。

グループ 1 の IGF-I/SeV 及び LacZ/SeV 両方のウイルス投与 7 日後の残料切片の投与部位の筋繊維には、筋周膜の浮腫形成、並びに細胞外空間における多数の単核食作用性マクロファージ、リンパ球、及びいくつかの好中球の浸潤と共に、多量の壊死による繊維分解が認められた（図 5d 及び g）。壊死領域内の残りの正常サイズの筋繊維は、多数の酸性ホスファターゼ陽性マクロファージにより侵襲されていた（図 5c 及び h）。しかし、尿液のみで処理された筋肉には、損傷は観察されず、筋肉内にほんのわずかなマクロファージの出現が見られた（図 5a 及び b）。以上を考え合わせると、SeV 導入は、感染筋肉において、損傷を引き起こし、壊死を誘導し、その後、壊死筋肉を除去するマクロファージ、リンパ球などの浸潤が起こる。しかし、壊死組織が残存していると再生が阻害されるため、食作用は、筋肉再生のためには極めて重要である。食作用後、筋前駆細胞又は衛星細胞が活性化され、その後筋芽細胞が増殖を開始することが知られている（実験医学 羊土社, 444-448, 3/2000）。さらに、プビバカイン処理 3 日後には、再生筋繊維の指標である、抗 MyHC モノクローナル抗体（BF-45）陽性単核細胞及び小さな筋管からなることが報告されている（Hum. Gene Ther. 5: 11-18 (1994)）。浸潤マクロファージ群中に中心核を有する極めて小さな筋繊維が、散在しているのが見られ、これらの細胞の BF-45 に対する免疫反応を調べた。LacZ/SeV 投与右前脛骨筋と比較して（図 5i）、hIGF-I/SeV 投与左前脛骨筋では、BF-45 陽性の多数の再生筋繊維が観察された（図 5f）。図 6 に示されるように、グループ 1 の動物において、BF-45 免疫陽性繊維の数の平均は、LacZ/SeV（右）の 44

3 2

6 (n=4) に対し、IGF-I/SeV (左) の 1,722 (n=4) であった。尿液中で処理された動物においては、BF-45 免疫陽性筋繊維は存在しなかった (グループ 4、図 5 c)。

ウイルスベクター投与 14 日後には、hIGF-I/SeV 及び LacZ/SeV の両方で処理された筋肉中のマクロファージの数は劇的に減少していた (図 7) (グループ 1、2、及び 3)。LacZ/SeV 処理筋肉においては、中心核を有する中程度の同サイズの筋繊維が増加した (図 7C)。他方、IGF-I/SeV 処理筋肉においては、散在するマクロファージと共にわずかな壊死繊維が残存しており (データは示していない)、小サイズの繊維を含む様々なサイズの筋繊維が観察された (図 7B)。これは、継続的な新生繊維形成を示している。hIGF-I/SeV、LacZ/SeV のいずれで処理された筋肉においても、繊維芽細胞の浸潤及びそれによる繊維化は観察されなかった。ウイルス導入 7 日後のマクロファージを中心とする間質細胞が占める空間は、再生した筋繊維に、ほぼ完全に置き換わっていることが見出された (図 7B 及び C)。

ウイルスベクター投与の 30 日後、グループ 1 の動物の処理筋肉において、筋肉のサイズはほぼ正常かつ均一に戻った (図 8 及び 9)。グループ 1 の hIGF-I/SeV 処理筋肉には、中サイズの筋繊維のクラスターが、正常サイズの筋繊維の中に散在していた (データは示していない)。グループ 1 の動物の hIGF-I/SeV 処理筋肉においては、LacZ/SeV 処理筋肉と比較して、筋繊維総数が 17% 増加していた ($p < 0.03$, $n = 4$) (図 9)。グループ 3 及び 4 においては、左右の筋肉の繊維数に、統計的有意差は存在しなかった (データは示していない)。さらに、肥大の結果としてよく見られる分裂繊維の数が増加していた。グループ 1 の動物の hIGF-I/SeV 処理筋肉においては、LacZ/SeV 処理筋肉と比較して、分裂繊維数の平均が 6.1 倍増加していた (図 9)。これらのデータは、この分裂現象が、hIGF-I/SeV 処理筋繊維の総数の増加を誘導した可能性を示している。

33

成熟骨格筋に対する IGF-I の効果を示した報告はいくつかなされており、Adams 及び McCue(J. Appl. Physiol. 84 (5); 1716-1722 (1998))は、正常ラット前脛骨筋における IGF-I タンパク質の局所注入の効果を調べた。IGF-I 注入筋肉において、筋肉重量、全タンパク質、及び全 DNA の有意な増加が見られた。しかし、彼らは、筋繊維の総数の増加は報告していない。Barton-Davis ら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15603-15607 (1998))は、AAV ベクターを用いて、IGF-I 遺伝子を高齢ラットに導入した。繊維再生及び筋肉肥大を示したが、再生筋繊維数増加は見られなかった。本発明者らの研究においては、過剰発現した hIGF-I の効果により、正常成体筋肉において、再生繊維、筋肥大繊維、及び全筋繊維数の有意な増加が観察された。観察された新生筋繊維形成は、SeV ベクターにより達成された高い IGF-I 発現レベルによることが考えられる。

【実施例 5】 精製 LacZ-SeV/dF 及び LacZ-SeV のマウス足筋肉における遺伝子発現の比較

発育鶏卵漿尿由来の付加型センダイウイルスベクター(LacZ-SeV)、及び LLC MK2/F/Ad 細胞由来の精製した F 欠失型 LacZ センダイウイルスベクター(LacZ-SeV/dF)の足筋肉内投与（投与量は 4×10^7 CIU/head）における遺伝子発現を、BALB/c マウスを用いて筋肉内投与法により比較検討した。

6 週齢の雄 BALB/c マウス 18 匹（日本チャールス・リバー株式会社）を実験に供した。動物は 6 週齢時に入荷、2 日間の馴化期間の後、各群 6 匹として、

（1）未処置、（2）LacZ-SeV (4×10^7 CIU/head)、（3）LacZ-SeV/dF (4×10^7 CIU/head)の 3 群に分けた。各ウイルス液は、エーテル麻酔下で、29G シリンジを用い、足を固定し、前脛骨筋両側に 1 匹あたり 2×10^8 CIU/ml、 $100 \mu\text{l} \times 2$ 箇所を投与した。投与後、約 1 分筋肉を揉みほぐした。

投与 3 日後に、エーテル麻酔下で解剖し、投与（右）側足筋肉を採材、LacZ アッセイに供した。

34

LacZ の定量方法は下記の通り行った。まず、足筋肉を摘出(2.0ml マイクロチューブ)し、液体窒素によって凍結した。次いで、500 μ l Lysis sol.を添加(筋肉重量約 500 mg)し、氷冷中でホモジナイズ(MultiPro)した。遠心分離(15000rpm x 15 分)し、測定用チューブに上清 10 μ l 採取した。次に、70 μ l Reaction Buffer A (Galacton-Plus 1 μ l + Reaction Buffer 99 μ l=100 μ l Kit; Galact o-Light-Plus, TROPIX, Cat no. 250065)を加え、遮光し室温で 30~60 分放置した。100 μ l Accelerator を加えルミノメーターにて測定した。

投与 3 日後の足筋肉における遺伝子発現(定量)を比較した結果、LacZ-SeV/dF および LacZ-SeV は未処理群に比べ明らかに強い発現を示した(図 10)。Lac Z-SeV/dF および LacZ-SeV を比較した場合、多少バラツキはあるもののほぼ同等の発現であることが分かった。これは筋肉内での二次感染の影響が低いためであると考えられる。筋肉疾患を遺伝子治療の対象とした場合、F 欠失型と付加型とでは遺伝子発現に差がないことから同等の効果が期待できる。

産業上の利用の可能性

本発明により、パラミクソウイルスベクターを利用して極めて高い効率で骨格筋へ遺伝子を導入することが可能となった。これにより、骨格筋を標的とした遺伝子治療、特に、全身性疾患及び神経筋障害のための基盤技術が提供された。また、本発明のパラミクソウイルスベクターを利用した、インスリン様増殖因子をコードする遺伝子の骨格筋への導入は、筋繊維の萎縮、減少、及び変性の治療への応用が期待される。これにより神経筋障害のための現在の治療法が強化されるであろう。

35

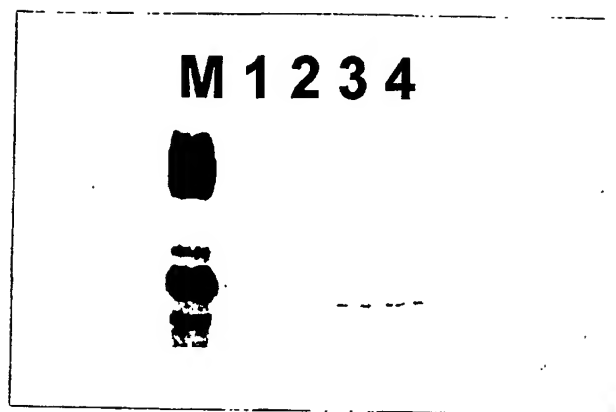
請求の範囲

1. 外来遺伝子が挿入されたパラミクソウイルスベクターを骨格筋に投与することを含む、外来遺伝子を骨格筋に導入する方法。
2. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項1に記載の方法。
3. 外来遺伝子が治療用遺伝子である、請求項1または2に記載の方法。
4. 外来遺伝子がインスリン様増殖因子をコードする遺伝子である、請求項1または2に記載の方法。
5. 骨格筋に外来遺伝子を導入するために用いる、外来遺伝子が挿入されたパラミクソウイルスベクター。
6. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項5に記載のベクター。
7. 外来遺伝子が治療用遺伝子である、請求項5または6に記載のベクター。
8. 外来遺伝子がインスリン様増殖因子をコードする遺伝子である、請求項5または6に記載のベクター。
9. 外来遺伝子が挿入されたパラミクソウイルスベクターを含む、骨格筋に外来遺伝子を導入するための組成物。
10. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項9に記載の組成物。
11. 外来遺伝子が治療用遺伝子である、請求項9または10に記載の組成物。
12. 外来遺伝子がインスリン様増殖因子をコードする遺伝子である、請求項9または10に記載の組成物。
13. 哺乳動物において再生筋繊維および／または分裂筋繊維を増加させるために用いられる、請求項12に記載の組成物。
14. 神経筋障害の治療に用いられる、請求項12に記載の組成物。

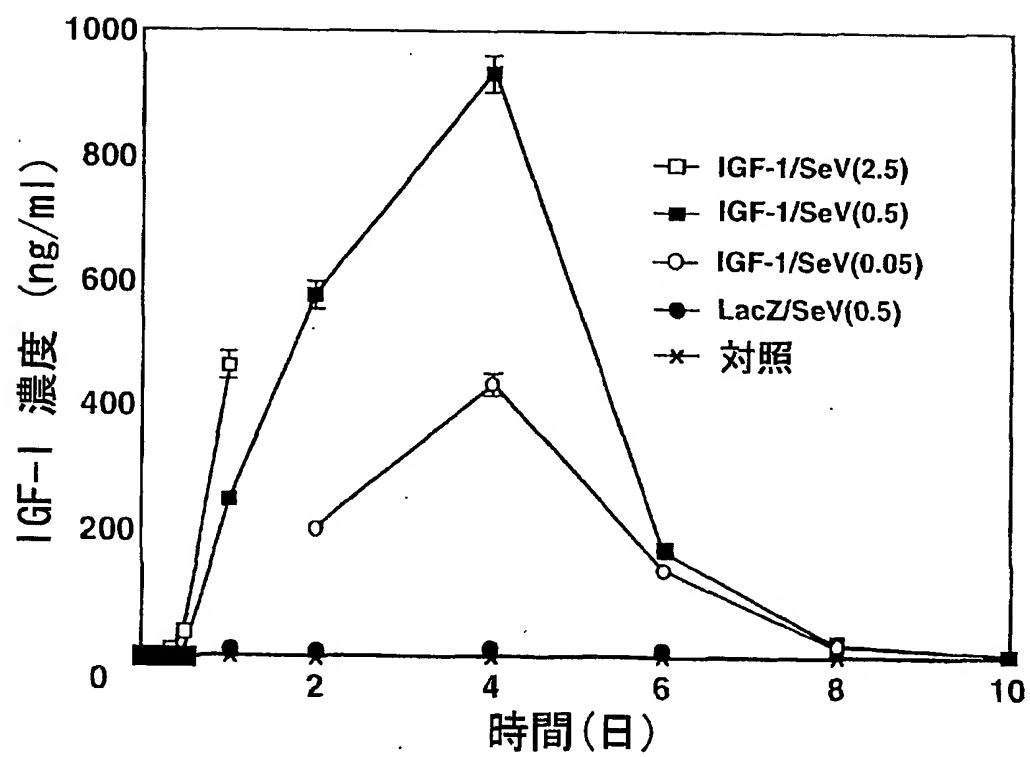
1/10

図 1

(A)



(B)



2/10

図 2

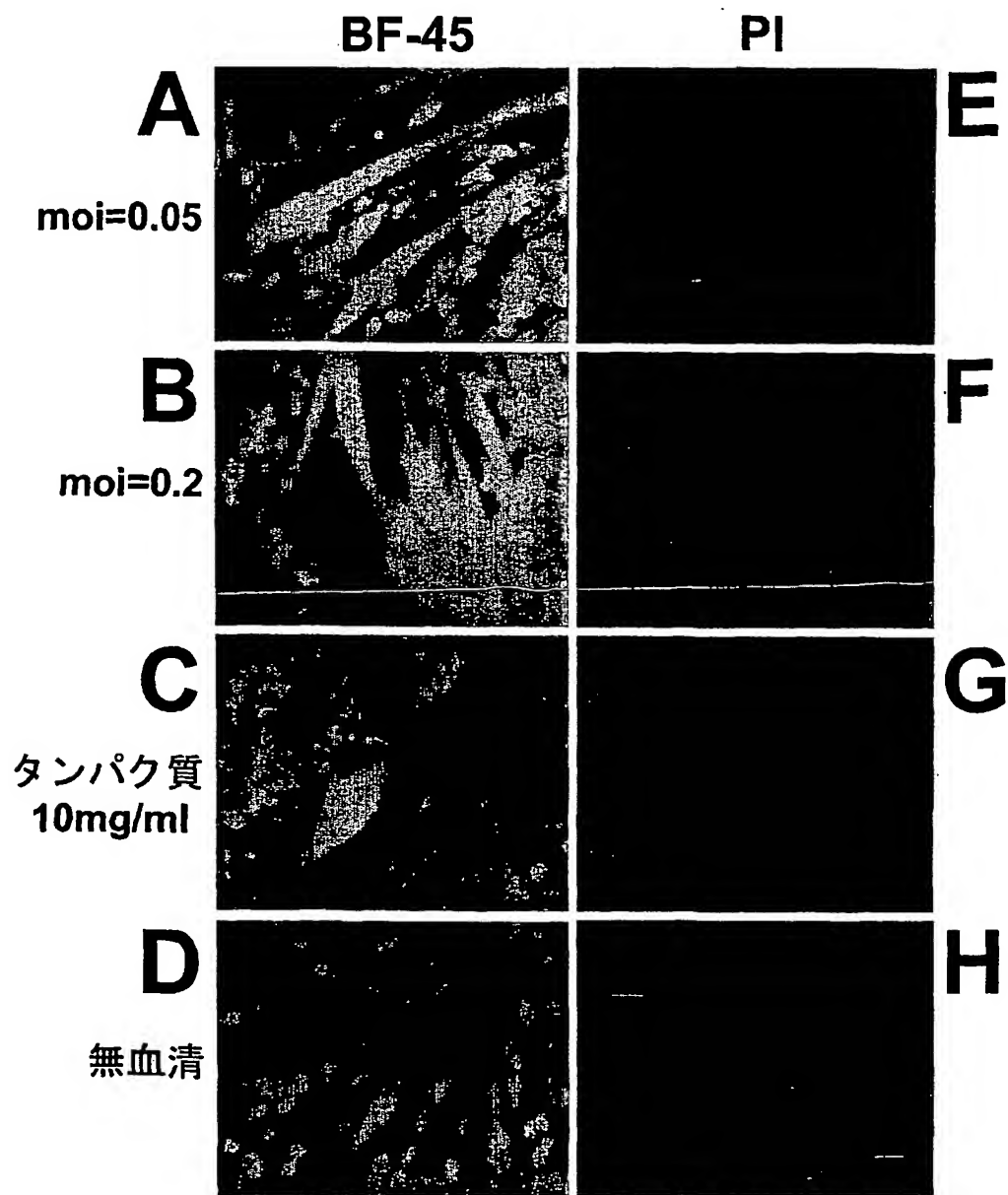
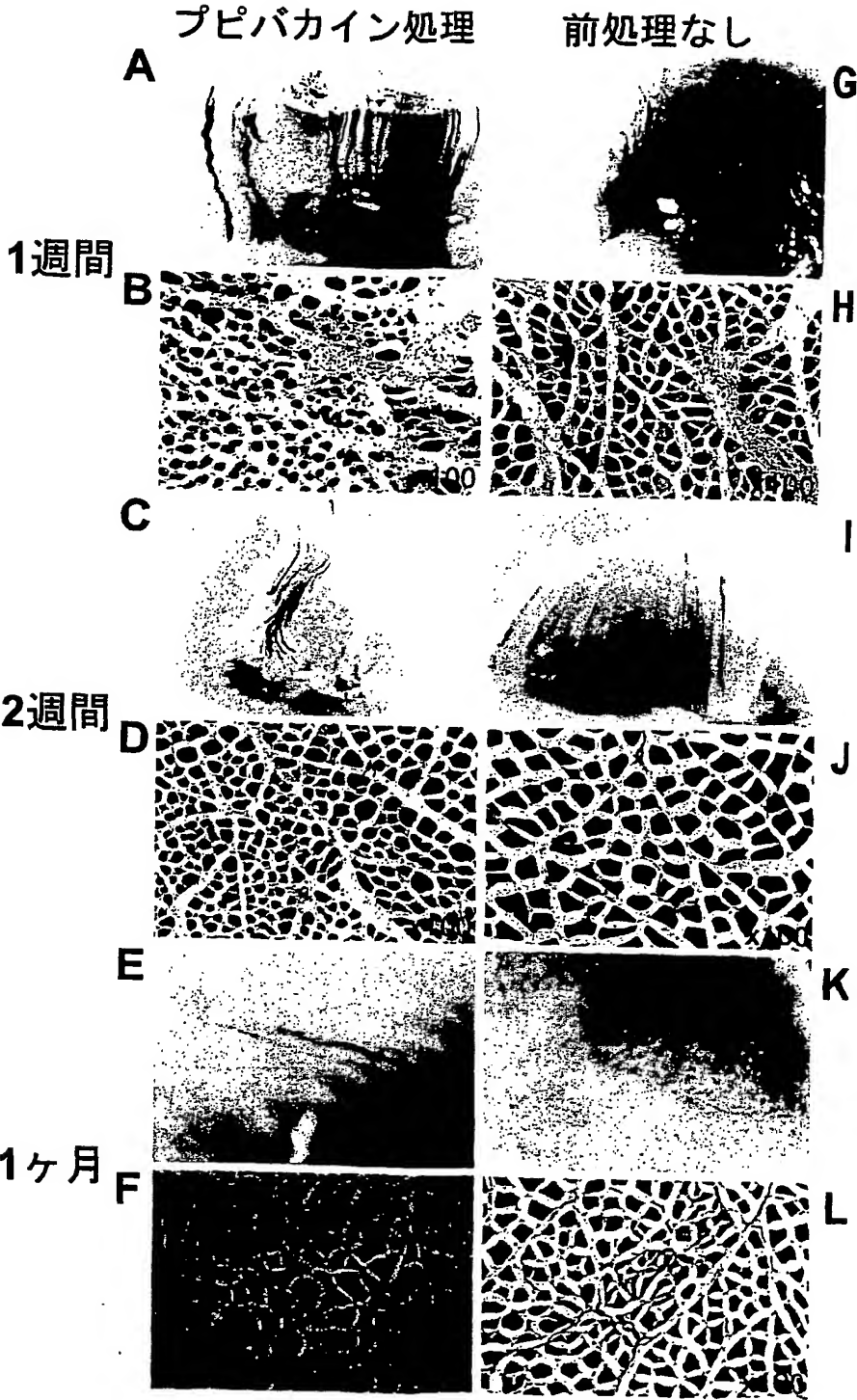


図3



4/10

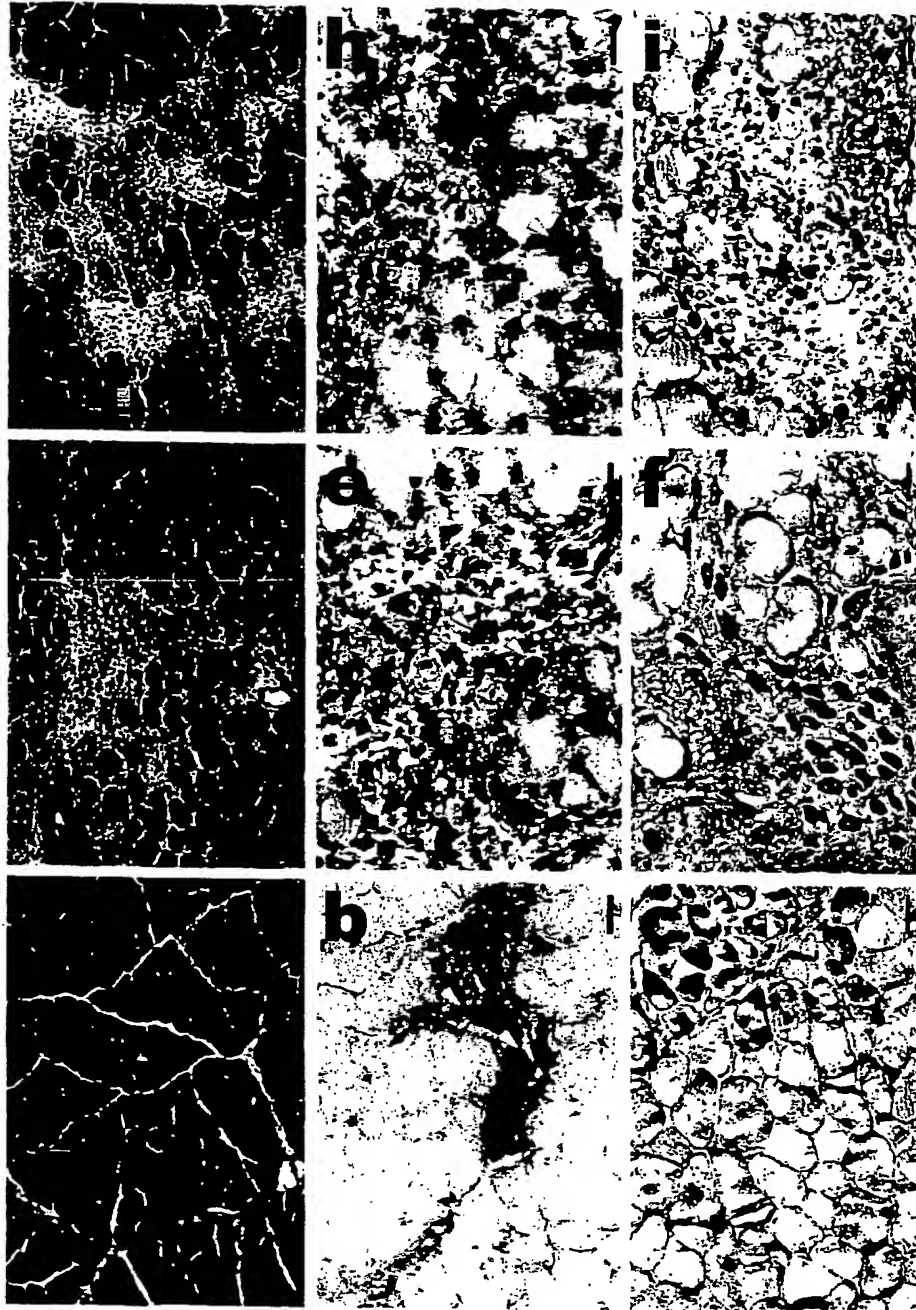
☒ 4

Kd M 1 2 3 4 5
14.4-



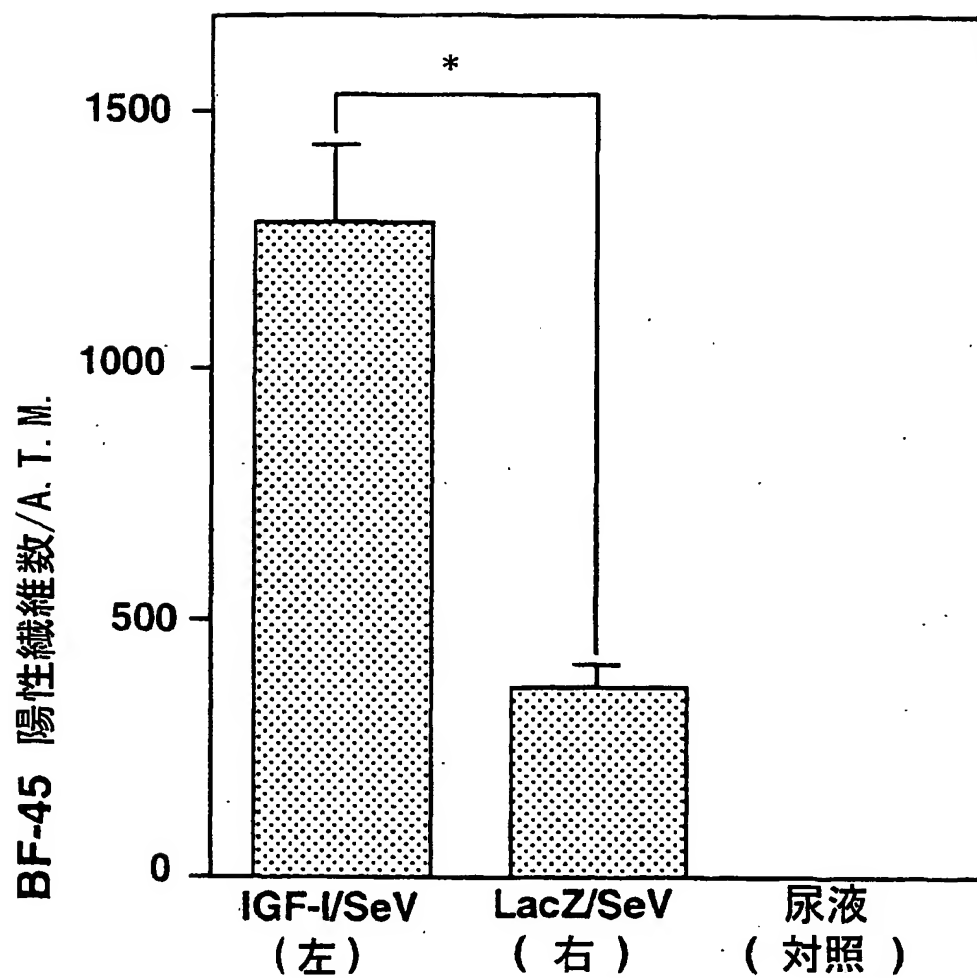
5/10

図 5



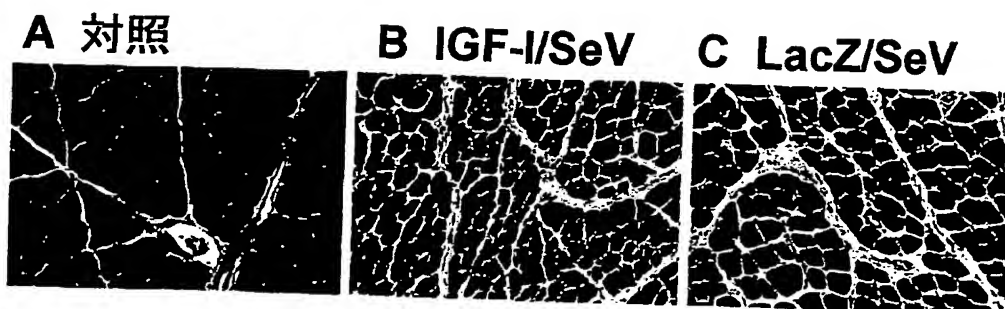
6/10

図 6



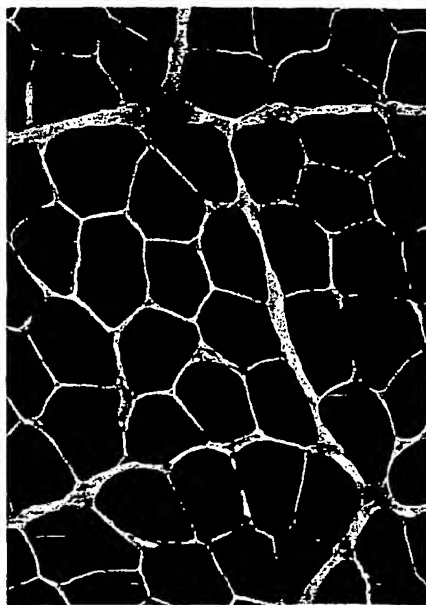
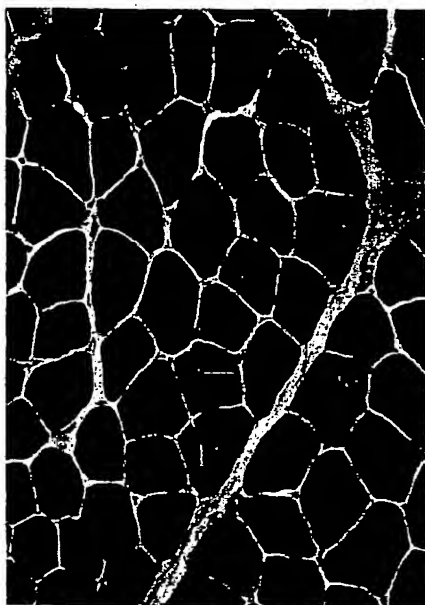
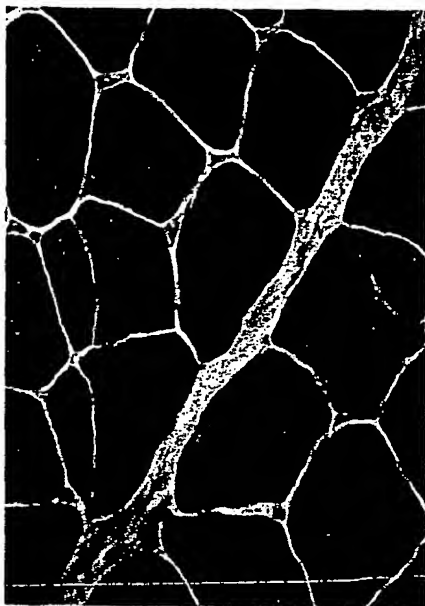
7/10

図 7



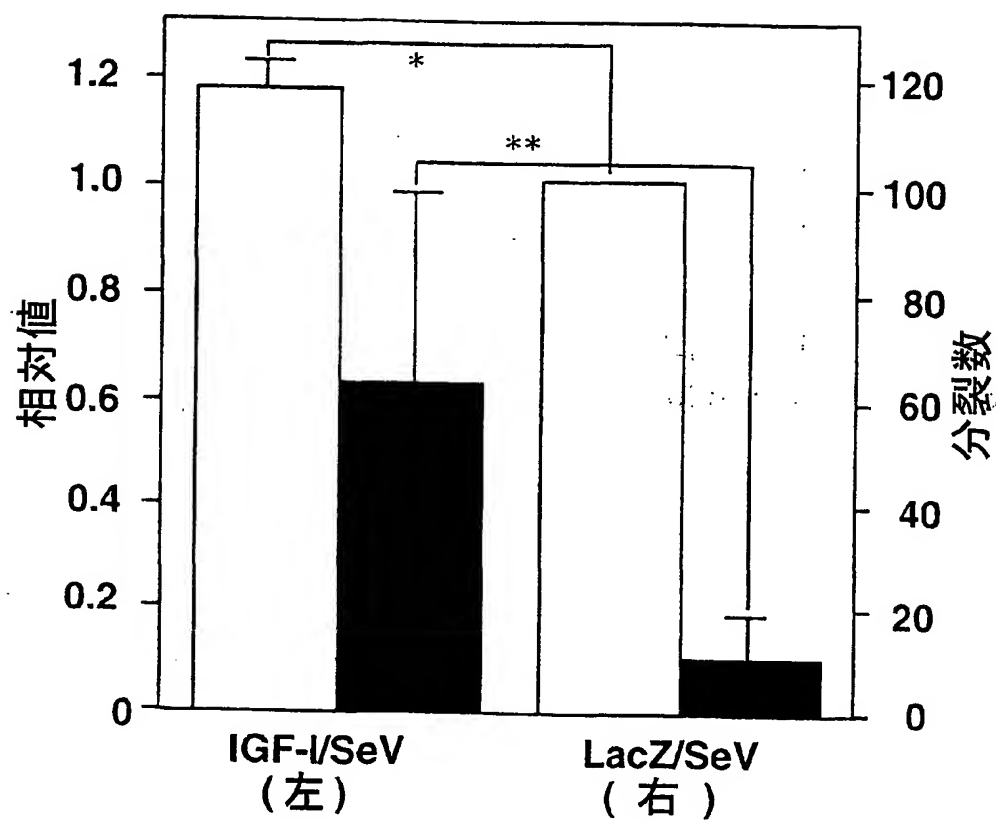
8/10

図 8



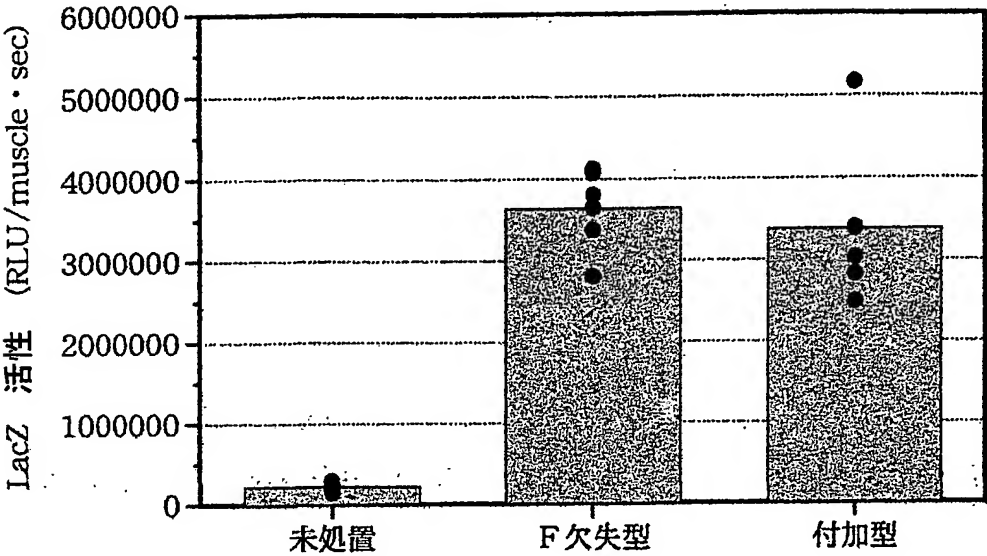
9/10

図 9



10/10

図 10



SEQUENCE LISTING

<110> Dनावेक Research Inc.

<120> Paramyxoviridae vectors for introducing exogenous genes
into skeletal muscle.

<130> D3-A0007P

<140>

<141>

<150> JP 2000-308533

<151> 2000-10-06

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

2

Synthesized Primer Sequence.

<400> 1

atccgaattc gcaatgggaa aaatcagcag tc

32

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence.

<400> 2

atccgaattc ctacatcctg tagttcttgc ttctctgc

37

<210> 3

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence.

3

<400> 3

atccgcggcc gccaaagttc agcaatggga aaaatcagca gtcttc

46

<210> 4

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence.

<400> 4

atccgcggcc gcgatgaact ttcaccctaa gtttttctta ctacggctac atcctgtagt 60
tcttgtttcc tgc 73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K35/76, A61K38/00, A61K48/00, A61P21/00, A61P25/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/09, A61K35/76, A61K38/00, A61K48/00, A61P21/00, A61P25/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2000-253876 A (Dnavec Research Inc.), 19 September, 2000 (19.09.00) (Family: none)	5-7, 9-11/ 8, 12-14
Y	Elisabeth R., et al., Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, December 1998, Vol.95, No.26, pp.15603-15607	8, 12-14
PX	BIOSIS NO.:200100395145 & A SHIOTANI et al., Skeletal muscle regeneration after insulin-like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector, Gene Therapy, July 2001, Vol.8, No.14, pp.1043-1050	5-14
A	BIOSIS NO.:199900311111 & Tomie KAWADA et al., Precise identification of gene products in hearts after in vivo gene transfection, using Sendai virus-coated proteoliposomes, Biochemical and Biophysical Research Communications, 07 June 1999, Vol.259, No.2, pp.408-413	5-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 December, 2001 (26.12.01)Date of mailing of the international search report
15 January, 2002 (15.01.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08372

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOSIS NO.:199800496034 & Y KANEDA et al., Fusigenic Sendai-virus liposomes: A novel hybrid type liposome for gene therapy, Biogenic Amines(1998), Vol.14, No.5, pp.553-572	5-14
A	WO 97/31656 A1 (Dnavec Research Inc., Yasufumi KANEDA), 04 September, 1997 (04.09.97) (Family: none)	5-14
A	JP 9-227413 A (Kirin Brewery Company, Limited.), 02 September, 1997 (02.09.97) (Family: none)	5-14
A	WO 97/16538 A1 (Dnavec Research Inc.), 09 May, 1997 (09.05.97), & EP 864645 A	5-14
A	WO 94/11506 (ARCH DEV CORP), 26 May, 1994 (26.05.94), & JP 8-506008 A & EP 668913 A	5-14
A	WO 93/06223 (CNRS CENT NAT RECH SCI), 01 April, 1993 (01.04.93), & JP 6-502771 A & EP 559884 A	5-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/08372

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
It substantially pertains to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09, A61K35/76, A61K38/00, A61K48/00, A61P21/00, A61P25/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N15/09, A61K35/76, A61K38/00, A61K48/00, A61P21/00, A61P25/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG) BIOSIS (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	JP 2000-253876 A (株式会社ディナベック研究所) 19.9月.2000 (19.09.00) (ファミリーなし)	5-7, 9-11/ 8, 12-14
Y	Elisabeth R., et al., Viral mediated expression of insulin-like growth factor I blocks the aging-related loss of skeletal muscle function, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, December 1998, Vol. 95, No. 26, p. 15603-15607	8, 12-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	26.12.01	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一
		4B 9162 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	BIOSIS NO.:200100395145 & A SHIOTANI et al., Skeletal muscle regeneration after insulin-like growth factor I gene transfer by recombinant Sendai virus vector, Gene Therapy, July 2001, Vol.8, No.14, p.1043-1050	5-14
A	BIOSIS NO.:199900311111 & Tomie KAWADA et al., Precise identification of gene products in hearts after in vivo gene transfection, using Sendai virus-coated proteoliposomes, Biochemical and Biophysical Research Communications, 7 June 1999, Vol.259, No.2, p.408-413	5-14
A	BIOSIS NO.:199800496034 & Y KANEDA et al., Fusigenic Sendai-virus liposomes: A novel hybrid type liposome for gene therapy, Biogenic Amines(199 8), Vol.14, No.5, p.553-572	5-14
A	WO 97/31656 A1 (株式会社ディナベック研究所、金田安史) 4.9月.1997 (04.09.97) (ファミリーなし)	5-14
A	JP 9-227413 A (麒麟麦酒株式会社) 2.9月.1997 (02.09.97) (ファミリーなし)	5-14
A	WO 97/16538 A1 (株式会社ディナベック研究所) 9.5月.1997 (09.05.97) & EP 864645 A	5-14
A	WO 94/11506 (ARCH DEV CORP) 26.5月.1994 (26.05.94) & JP 8-506008 A & EP 668913 A	5-14
A	WO 93/06223 (CNRS CENT NAT RECH SCI) 1.4月.1993 (01.04.93) & JP 6-502771 A & EP 559884 A	5-14

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 実質的に人の治療方法である。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

DESCRIPTION

PARAMYXOVIRUS VECTORS FOR INTRODUCING FOREIGN GENES INTO SKELETAL
MUSCLE

5

Technical Field

The present invention relates to Paramyxovirus vectors for introducing exogenous foreign genes into skeletal muscle.

10 Background Art

The subfamily *Paramyxovirinae* comprises three genera (*Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, and *Filoviridae*) of enveloped viruses that contain non-segment negative strand RNA genomes that function as templates for the synthesis of mRNA and anti-stranded
15 genomes. Sendai virus (SeV) belongs to *Paramyxoviridae* whose pathogenicity to human has been denied from early studies in virology (Nagai, Y. and Ishihama, A., The viral experimental protocol (1995. 4)). SeV has a strict cytoplasmic life cycle in mammalian cells and its transferred RNA is maintained in the cytoplasm without interacting
20 with the chromosomes of host cell. Therefore, SeV may be safely used for human gene therapy. The entire genome nucleotide sequence of the SeV Z strain used herein had been determined by Shibuta et al. in 1986. Success in the recovery of an infectious virus from the transfected cDNA of SeV enabled genetic engineering technology
25 (Conzelmann, K. K., Annu. Rev. Genet. 32, 123-162 (1998); Nagai, Y., and Kato, A., Microbiol. Immunol. 43, 613-624 (1999)). Moreover, a variety of foreign genes with additional transcription units have been inserted at appropriate genome positions and have been expressed in SeV at extremely high levels (Yu, D., Shioda, T., Kato, A., Hasan, M. K., Sakai, Y., and Nagai, Y., Genes Cells 2, 457-466 (1997)).

Insulin like growth factor I (IGF-I) plays an important role in the development, maintenance, and regeneration of skeletal muscle. The effect of IGF-I on myogenic cells includes stimulation of myoblast replication, myogenic differentiation, and myotube hypertrophy (Annu.
35 Rev. Physiol. 53, 201-216 (1991); Endocr. Rev., 17 481-516 (1996); Cell. 75, 59-72 (1993); Genes Dev. 7, 2609-2617 (1993)). In muscle

THIS PAGE BLANK (USPTO)

regeneration, proliferation of muscle precursor cells, fusion into myotubes and reinnervation are involved. IGF-I, which is produced in satellite cells, acts as a powerful stimulant for proliferation and differentiation of muscle precursor cells (Acta Physiol. Scand. 167, 301-305 (1999)). IGF-I gene transfer to skeletal muscle has already been applied to the treatment of denervated skeletal muscle atrophy using non-viral technology and age-related loss of skeletal muscle function using the AAV vector (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 15603-15607 (1998)).

Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide Paramyxovirus viral vector that ensures highly efficient transfer of foreign genes into skeletal muscle cells and use thereof. More specifically, the present invention provides a Paramyxovirus vector for introducing foreign genes into skeletal muscle, composition comprising the vector for foreign gene transfer into skeletal muscle, and method for introducing foreign genes into skeletal muscle using this vector. As a preferred embodiment of the present invention, a Paramyxovirus vector wherein a gene encoding a insulin-like growth factor has been inserted is provided, and use of this vector for the formation of myofibers are provided.

Skeletal muscle is an attractive site for the delivery and expression of exogenous genes encoding therapeutic proteins for the treatment of systemic diseases and neuromuscular disorders. The present inventors investigated the feasibility of using the recombinant Sendai virus (SeV) vector containing LacZ reporter gene and human insulin-like growth factor-I (hIGF-I) gene for gene delivery into skeletal muscle

A large number of X-gal labeled myofibers were detected in animals with/without bupivacaine treatment 7 days after the intramuscular injection of LacZ/SeV, and the transgene expression continued up to one month post-injection. Recombinant hIGF-I derived from IGF-I/SeV was detected as the major protein species in culture supernatants of L6 cells; and thus the induced L6 cells was determined to undergo morphological changes, such as multinuclear organization

THIS PAGE BLANK (USPTO)

and hypertrophy. The introduction of IGF-I/SeV into the muscle led to significant increases in regenerating myofibers and splitting myofibers, which were indicative of hypertrophy, and also an increase in the total number of myofibers, in comparison to those seen in the LacZ/SeV treated control. These results demonstrated that Paramyxovirus containing SeV achieves high-level transgene expression in skeletal muscle, and that IGF-I gene transfer using Paramyxovirus vector may have a great potential in the treatment of neuromuscular disorders.

- Specifically, the present invention relates to a Paramyxovirus vector gene for introducing a foreign gene into skeletal muscle, method for introducing a foreign gene into skeletal muscle using the vector, and a Paramyxovirus vector wherein an insulin-like growth factor has been inserted as a foreign gene, and use thereof for the formation of myofibers. More specifically, the present invention provides:
- [1] a method for introducing a foreign gene into skeletal muscle, wherein said method comprises the step of administering a Paramyxovirus vector inserted with the foreign gene into skeletal muscle;
 - [2] the method according to [1], wherein the Paramyxovirus is Sendai virus;
 - [3] the method according to [1] or [2], wherein the foreign gene is a therapeutic gene;
 - [4] the method according to [1] or [2], wherein the foreign gene is a gene that encodes an insulin-like growth factor;
 - [5] a Paramyxovirus vector inserted with a foreign gene which is used for introducing the foreign gene into skeletal muscle;
 - [6] the vector according to [5], wherein the Paramyxovirus is Sendai virus;
 - [7] the vector according to [5] or [6], wherein the foreign gene is a therapeutic gene;
 - [8] the vector according to [5] or [6], wherein the foreign gene encodes an insulin-like growth factor;
 - [9] a composition for introducing a foreign gene into skeletal muscle which comprises a Paramyxovirus vector inserted with the foreign gene;
 - [10] the composition according to [9], wherein the Paramyxovirus is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sendai virus;

[11] the composition according to [9] or [10], wherein the foreign gene is a therapeutic gene;

[12] the composition according to [9] or [10], wherein the foreign gene encodes an insulin-like growth factor;

[13] the composition according to [12] which is used for increasing regenerating myofibers and/or splitting myofibers in mammal; and

[14] the composition according to [12] which is used for the treatment of neuromuscular disorders.

10

Herein, the phrase "Paramyxovirus vector" is defined as a vector (or carrier) that is derived from Paramyxovirus and that is used for gene transfer into host cells. The Paramyxovirus vector of the present invention may be ribonucleoprotein (RNP) or a virus particle having infectivity. Herein, "infectivity" is defined as the ability of the recombinant Paramyxovirus vector to transfer, through its cell adhesion and membrane fusion abilities, a gene contained in the vector into cells to which the vector is adhered. In a preferred embodiment, a foreign gene is integrated into the Paramyxovirus vector of the present invention in an expressible manner by genetic engineering. The Paramyxovirus vector may have replication ability, or may be a defective vector without replication ability. Herein, "replication ability" is defined as an ability of virus vectors to replicate and produce infective virus particles in host cells that are infected with the virus vectors.

25

Herein, the term "recombinant" Paramyxovirus vector is defined as a Paramyxovirus vector constructed via genetic engineering or amplified products thereof. For instance, recombinant Paramyxovirus vectors can be generated by reconstitution from a recombinant Paramyxovirus cDNA (Nagai, Y., and Kato, A., Microbiol. Immunol. 43, 613-624 (1999)).

30

Herein, the term "Paramyxovirus" is defined as a virus of the *Paramyxoviridae* family or a derivative thereof. Paramyxoviruses that can be used in the present invention include, viruses belonging to the family *Paramyxoviridae*, such as, Sendai virus, Newcastle disease virus, Mumps virus, Measles virus, respiratory syncytial virus (RSV),

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and type I, II, and III human parainfluenza virus. The virus of the present invention may be preferably a virus of the genus Paramyxovirus or a derivative thereof.

5 Examples of Paramyxoviruses that can be used in the present invention include type 1 parainfluenza viruses, such as, Sendai virus and human HA2 virus; type 2 parainfluenza viruses, such as monkey SV5, SV41, and human CA virus; type 3 parainfluenza viruses, such as bovine SF and human HA1 virus; type 4 parainfluenza viruses
10 (including subtypes A and B); Mumps virus; Newcastle disease virus; and numerous other Paramyxoviruses. Most preferably, the Paramyxovirus of the present invention may be the Sendai virus. These viruses may be naturally-occurring, mutants, laboratory-passaged strains, artificially constructed strains, etc. Incomplete viruses
15 such as the DI particle (Willenbrink, W., and Neubert, W. J., J. Virol. 68, 8413-8417 (1994)), synthesized oligonucleotides, and so on, may also be utilized as material for generating a viral vector of the present invention.

Genes encoding proteins of Paramyxovirus include NP, P, M, F, HN, and L genes. Herein, the "NP, P, M, F, HN, and L genes" represent
20 those encoding the nucleocapsid protein, phosphoprotein, matrix protein, fusion protein, hemagglutinin-neuraminidase, and large protein, respectively. Genes of each virus of the subfamily Paramyxovirus are described generally as follows. In general, NP gene
25 may also be indicated as "N gene."

Paramyxovirus	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
Rublavirus	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
Morbillivirus	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

For instance, the accession numbers of each gene of Sendai virus
30 classified as a Respirovirus of *Paramyxoviridae* in the nucleotide sequence database, are M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, and X17218 for NP gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, and X17008 for P gene; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056 for M gene; D00152, D11446,
35 D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, and X02131 for F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

X02808, X56131 for HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, and X58886 for L gene.

As used herein, the term "gene" refers to a genetic substance including nucleic acids, such as RNA and DNA. A gene may or may not
5 encode a protein. For example, a gene may encode a functional RNA such as ribozyme or antisense RNA. A gene can be a naturally-occurring sequence or an artificially designed sequence. Furthermore, as used herein, the term "DNA" includes single-stranded DNA and/or double-stranded DNA.

10 Herein, the term "skeletal muscle," as employed in this specification refers to muscles showing a striped pattern, and includes cardiac muscle.

The present invention provides the use of Paramyxovirus vector for gene transfer into skeletal muscle. The present inventors found
15 that Sev of Paramyxovirus could allow introduction of genes into skeletal muscle with high efficiency. Skeletal muscle is important as a target for the treatment of systemic diseases and neuromuscular disorders, and thus the vector of the present invention can be suitably used for gene therapy of such diseases.

20 In addition, the present inventors revealed that the genes transferred into skeletal muscle using a recombinant SeV vector were persistently expressed over one month. This shows an advantage that continuous therapeutic effect can be obtained when gene therapies targeted at skeletal muscle was performed using a recombinant SeV
25 vector.

It is suggested that Paramyxovirus vectors can be preferably utilized in clinical trials of human gene therapy because they are safe and also because the vectors are not pathogenic to humans. First, it is a major obstacle in high efficient gene expression that
30 introduced DNA must be transported into the nucleus, or the nuclear membrane must be lost for the expression of a foreign gene. However, in the case of Sendai virus and such expression of a foreign gene in host cell is driven by both cellular tubulin and its own RNA polymerase (L protein) in the cytoplasm with the replication of viral
35 genome. This suggests that the genome of Sendai virus does not interact with the chromosome of host cells, which means that

THIS PAGE BLANK (USPTO)

chromosomal aberration and immortalization leading to risks such as tumorigenesis are avoided. Second, the Sendai virus is known to be pathogenic in rodents causing pneumonia, but not in humans, which is supported by studies showing that the intranasal administration of wild type Sendai virus does not harm nonhuman primates (Hurwitz, J. L. et al., Vaccine 15, 533-540 (1997)). These features suggest that Sendai virus vector can be utilized in human therapy, and further support the notion that Sendai virus can be a promising alternative in gene therapy to skeletal muscle.

Thus, the finding of the present inventors that Paramyxovirus vector is effective in gene transfer into skeletal muscle may greatly advance gene therapy, especially those targeted at skeletal muscle.

The recombinant Paramyxovirus vector of the present invention used for gene transfer into skeletal muscle is not limited to any specific kind. For instance, suitable Paramyxovirus vectors include vectors that are able to replicate and autonomously propagate. In general, the genome of wild type Paramyxovirus contains a short 3' leader region followed by six genes encoding N (nucleocapsid), P (phospho), M (matrix), F (fusion), HN (hemagglutinin-neuraminidase), and L (large) proteins, and has a short 5' trailer region at the other terminus. The vector of the present invention that is able to replicate autonomously can be obtained by designing a genome having a similar structure to that described above. In addition, a vector for expressing an exogenous gene can be obtained by inserting the exogenous gene to the genome of the above vector. The Paramyxovirus vector of the invention may have an altered alignment of virus genes compared to the wild type virus.

The Paramyxovirus vector of the invention may have deletion(s) of some of the genes that are contained in wild type virus. For instance, when Sendai virus vector is reconstituted, proteins encoded by NP, P/C, and L genes are thought to be required in trans, but the genes are not required to be a component of the virus vector. In one embodiment, an expression vector carrying genes encoding the proteins may be co-transfected into host cells with another expression vector encoding the vector genome to reconstitute a virus vector. Alternatively, an expression vector encoding the virus genome is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

transfected into host cells carrying genes encoding the proteins, and thus a virus vector can be reconstituted using the proteins provided by the host cell. The amino acid sequence of these proteins are not required to be identical to those derived from the original virus as long as they have an equivalent or higher activity in nucleic acid transfer, and may be mutated or replaced with those of homologous genes of other viruses.

Proteins encoded by M, F, and HN genes are thought to be essential for cell-to-cell propagation of a Paramyxovirus vector. However, these proteins are not required when the vector is prepared as RNP. If genes M, F, and HN are components of the genome contained in RNP, products of these genes are produced when introduced into host cells, and virus particles having infectivity are generated.

RNP can be introduced into cells as a complex with a transfection reagent, such as, lipofectamine and polycationic liposome. Specifically, a variety of transfection reagents can be used, for instance, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169), etc. Chloroquine may be added to prevent degradation in the endosome (Calos, M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3015 (1983)). In the case of replicative viruses, the produced viruses can be amplified or passaged by re-infecting them into cultured cells, chicken eggs, or animals (e.g., mammals such as mice).

Vectors lacking the M, F, and/or HN genes are also used as the Paramyxovirus vector of the present invention. These vectors can be reconstituted by exogenously providing deleted gene products. Such vectors can still adhere to host cells and induce cell fusion like the wild type. However, daughter virus particles do not have the same infectivity as the original ones because the vector genome introduced into cells lacks one of the above genes. Therefore, these vectors are useful as safe virus vectors that are capable of only a single gene transfer. For instance, genes deleted from the genome may be F and/or HN genes. Virus vectors can be reconstituted by co-transfection of an expression plasmid encoding the genome of a recombinant Paramyxovirus lacking the F gene, an expression vector for the F protein, and that for NP, P/C, and L proteins into host

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cells (International Application numbers PCT/JP00/03194 and PCT/JP00/03195). Alternatively, host cells wherein the F gene is integrated into the chromosome may also be used for the reconstitution of vectors. The amino acid sequences of these exogenously provided
5 proteins do not have to be identical to those of the wild type and may be mutated or replaced by homologous proteins of other viruses as long as they provide equivalent or higher gene transfer activity.

The envelope protein of the Paramyxovirus vector of the invention may contain a protein other than the envelope protein of
10 the original vector genome. According to the present invention, there is no limitation on such proteins. These include envelope proteins of other viruses such as the G protein of the vesicular stomatitis virus (VSV-G). Thus, the Paramyxovirus vector of the invention includes a pseudo type virus vector that has an envelope protein
15 derived from a virus different from the original virus.

The Paramyxoviral vector of the present invention may also comprise, for example, on the viral envelop surface, proteins capable of adhering to particular cells, such as adhesion factors, ligands and receptors, or chimeric proteins that comprises such proteins on
20 the outer surface and viral envelop-derived polypeptides inside the virus. Such proteins enable production of a vector targeting a particular tissue. These proteins may be encoded by the virus genome itself, or supplied at the time of virus reconstitution through the expression of genes other than from the virus genome (for example,
25 genes derived from another expression vector or host cell chromosome).

The virus genes contained in the vector of the present invention may be altered, for example, to reduce antigenicity or enhance RNA transcription efficiency or replication efficiency. Specifically, it is possible to alter at least one of the NP, P/C, and L genes,
30 which are genes of replication factors, to enhance transcription or replication. It is also possible to alter the HN protein, a structural protein having hemagglutinin activity and neuraminidase activity, to enhance the virus stability in blood by weakening the former activity and to regulate infectivity by altering the latter activity.
35 The fusion ability of membrane-fused liposomes can be altered by modifying the F protein that is involved in membrane fusion.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Furthermore, it is possible to analyze the antigen presenting epitopes and such of possible antigenic molecules on the cell surface, such as the F protein and HN protein, and use them to generate a Paramyxovirus that is engineered to have weak antigen presenting ability.

5 A viral vector of the present invention can encode foreign genes in its genomic RNA. A recombinant Paramyxovirus vector comprising foreign genes can be prepared by inserting foreign genes into the above-mentioned Paramyxovirus vector genome. The foreign gene can be a desired gene to be expressed in target skeletal muscle. The
10 foreign gene may encode a naturally occurring protein, or a modified protein prepared by modifying the original protein by deletion, substitution or insertion, as long as the modified protein is functionally equivalent to the naturally occurring protein. For instance, for the purpose of gene therapy and such, a gene to treat
15 a target disease may be inserted into the virus vector DNA. In the case of inserting a foreign gene into Sendai virus vector DNA, a sequence having nucleotides of multiples of six is desirably inserted between the transcription end sequence (E) and the transcription start sequence (S) (Calain, P., and Roux, L., J. Virol. 67(8), 4822-4830
20 (1993)). A foreign gene can be inserted upstream and/or downstream of each of the virus genes (NP, P, M, F, HN, and L genes). In order not to interfere with the expression of upstream and downstream genes, an E-I-S sequence (transcription end sequence-intervening sequence-transcription start sequence) or a portion of it may be
25 suitably placed upstream or downstream of the foreign gene. Alternatively, the foreign gene can be inserted via IRES sequence.

Expression level of inserted foreign genes can be regulated by the type of transcription start sequence that is attached to the upstream of the genes. It also can be regulated by the position of
30 insertion or the sequence surrounding the gene. In Sendai virus, for instance, the closer the insertion position to the 3'-terminus of the negative strand RNA of the virus genome (the closer to NP gene in the gene arrangement on the wild type virus genome), the higher the expression level of the inserted gene will be. To achieve a high
35 expression of a foreign gene, it is preferably inserted into the upstream region of the negative stranded genome such as the upstream

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of the NP gene (3' flanking sequence on the minus strand), or between NP and P genes. Conversely, the closer the insertion position to the 5'-terminus of the negative strand RNA (the closer to L gene in the gene arrangement on the wild type virus genome), the lower the expression level of the inserted gene will be. To reduce the expression of a foreign gene, it should be inserted as close as possible to the 5' terminus on the negative strand, that is, downstream of the L gene in the wild type virus genome (5' flanking region of the L gene on the negative strand) or upstream of the L gene (3' flanking region of L gene on the negative strand). Thus, the insertion position of a foreign gene can be properly adjusted so as to obtain a desired expression level of the gene or optimize the combination of the insert with the surrounding virus genes. To enable simple insertion of a foreign gene, a cloning site may be designed at the position of insertion. For example, the cloning site may be a recognition sequence of restriction enzymes. The restriction sites in the vector DNA encoding genome can be used to insert a foreign gene. The cloning site may be a multicloning site that contains recognition sequences for multiple restriction enzymes. The vector of the present invention may have other foreign genes at positions other than that used for the above insertion.

Construction of recombinant Sendai virus vector having a foreign gene can be performed, for example, as follows according to the method described in Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-587 (1997); and Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466 (1997).

First, a DNA sample containing a cDNA sequence encoding a desired foreign gene is prepared. It is preferable that the concentration of the sample is 25 ng/ μ l or higher and that it can be detected as a single plasmid by electrophoresis. The following description is an example where a foreign gene is inserted into the NotI site of virus genomic DNA. If the desired cDNA sequence contains a NotI site, the site is desirably removed in advance by altering the nucleotide sequence using known methods, such as site-directed mutagenesis, while maintaining the encoded amino acid sequence. The desired DNA fragment is amplified by PCR from the DNA sample. In order to obtain fragments having NotI sites at both ends and to add a single

THIS PAGE BLANK (USPTO)

copy of the transcription end sequence (E), intervening sequence (I), and transcription start sequence (S) of the Sendai virus (EIS sequence) to one end, a primer pair, i.e., synthesized DNA sequences as a forward primer and a reverse primer (antisense strand), which comprises a
 5 *NotI* recognition site; E, I, and S sequences; and part of the desired gene, is prepared.

For example, the forward synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus to ensure digestion with *NotI* (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the
 10 *NotI* recognition site, such as, GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the sequence, the *NotI* recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus any 9 nucleotides or 9 plus multiples of 6 nucleotides are added as a spacer. Furthermore, a sequence of approximately 25 nucleotides corresponding to the ORF
 15 of the desired cDNA starting with the initiation codon ATG is added to the 3'-terminus. The 3'-terminus of the forward synthetic oligo DNA containing approximately 25 nucleotides of the desired cDNA is preferably selected so that the last nucleotide is G or C.

The reverse synthetic DNA sequence contains two or more
 20 nucleotides at the 5'-terminus (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the *NotI* recognition site, such as, GCG and GCC; more preferably ACTT). The *NotI* recognition sequence GCGGCCGC is added to the 3'-terminus of the sequence. Furthermore, a spacer oligo DNA is added to the 3'-terminus in order to adjust
 25 the length of the primer. The length of the oligo DNA is designed so that it is a multiple of 6 nucleotides including the *NotI* recognition sequence GCGGCCGC, the sequence complementary to the cDNA, and the EIS sequence derived from the Sendai virus genome as described below (so-called "rule of six"; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72, 891-899
 30 (1998)). Furthermore, to the 3'-terminus of the added sequence, complementary sequence to the S sequence of the Sendai virus (preferably 5'-CTTTCACCCT-3'), the I sequence (preferably 5'-AAG-3'), and complementary sequence to the E sequence (preferably 5'-TTTTTCTTACTACGG-3') are added. Finally, a sequence of the
 35 complementary strand of the desired cDNA, which sequence is selected so that the last nucleotide becomes G or C, is added as the 3'-terminus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of the reverse synthetic oligo DNA, wherein the last nucleotide is approximately 25 nucleotides upstream from the termination codon of the cDNA.

PCR can be performed by common methods in the art, such as, ExTaq polymerase (TaKaRa). Vent polymerase (NEB) may be preferably used and the amplified fragment digested with *Not*I and inserted into the *Not*I site of the plasmid vector pBluescript. The nucleotide sequence of the obtained PCR product is checked with an automated DNA sequencer and a plasmid having the correct sequence is selected. The insert is excised from the plasmid by *Not*I digestion, and subcloned into the *Not*I site of the plasmid comprising genomic cDNA. Alternatively, the PCR products may be directly cloned into the *Not*I site without using pBluescript vector to obtain recombinant SeV cDNA.

A viral genome-encoding DNA is ligated with an appropriate transcriptional promoter to construct a vector DNA. The resulting vector is transcribed *in vitro* or in cells and RNP is reconstituted in the presence of viral L, P, and NP proteins to produce a viral vector comprising the RNP. Reconstitution of a virus from viral vector DNA can be performed according to known methods (WO97/16539; WO97/16538; Durbin, A. P. et al., *Virol.* 235, 323-332 (1997); Whelan, S. P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8388-8392 (1995); Schnell, M. J. et al., *EMBO J.* 13, 4195-4203 (1994); Radecke, F. et al., *EMBO J.* 14, 5773-5784 (1995); Lawson, N. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4477-4481 (1995); Garcin, D. et al., *EMBO J.* 14, 6087-6094 (1995); Kato, A. et al., *Genes Cells* 1, 569-579 (1996); Baron, M. D., and Barrett, T., *J. Virol.* 71, 1265-1271 (1997); Bridgen, A., and Elliott, R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15400-15404 (1996)). These methods enable reconstitution of Paramyxovirus vectors including the parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus, rinderpest virus, and Sendai virus vectors from DNA. When the F, HN, and/or M genes are deleted from the virus vector DNA, infective virus particles will not be formed. However, it is possible to generate infective virus particles by introducing these deleted genes and/or genes encoding an envelope protein from another virus into the host cells and expressing them.

Methods for introducing vector DNA into desired cells include:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(1) a method involving the step of forming DNA precipitates that can be incorporated into desired cells; (2) a method involving the step of preparing a complex that comprises positively charged DNA having low cytotoxicity and which is suitable for the incorporation into
5 desired cells; and (3) a method using electrical pulse for instantaneously opening a pore in the desired plasma membrane large enough for a DNA molecule to pass through.

A variety of transfection reagents can be used in (2), for instance, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE,
10 and DOSPER (Boehringer #1811169). For (1), transfection using calcium phosphate can be used. In this method, DNA incorporated by cells is taken up into phagocytic vesicles, but it is known that a sufficient amount of DNA is also introduced into the nucleus (Graham, F. L., and van Der Eb, J., *Virology* 52, 456 (1973); Wigler, M., and Silverstein, S., *Cell* 11, 223 (1977)). Chen and Okayama (Chen, C., and Okayama, H., *Mol. Cell. Biol.* 7, 2745 (1987)) studied the optimization of the transfer technology and reported that: (a) maximal efficiency is obtained when cells and precipitates are incubated under 2 to 4% CO₂ at 35°C for 15 to 24 hr; (b) circular DNA has higher activity
20 than linear DNA; and (c) the optimal precipitates are formed when the DNA concentration in the mixed solution is 20 to 30 µg/ml. The method of (2) is suitable for transient transfection. A classic transfection method wherein DEAE-dextran (Sigma #D-9885; M. W. 5 x 10⁵) is mixed with DNA at a desired concentration ratio is known in the art. Because most complexes are degraded in the endosome, chloroquine may be added to enhance the transfection efficiency (Calos, M. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3015 (1983)). The method of (3), called electroporation, may be more broadly applied than the method (1) or (2) because it can be applied to any kind of cell. High
30 transfection efficiency can be obtained by optimizing the duration of pulse currents, the form of pulse, the strength of the electrical field (gap between electrodes and voltage), conductivity of buffer, DNA concentration and cell density.

Among the above-mentioned three methods, the method using
35 transfection reagent (i.e., method (2)) is suitable for the present invention due to its ease of performance, whereby testing of a large

THIS PAGE BLANK (USPTO)

number of samples using a large amount of cells is possible. Preferred transfection reagents include, Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, #301305) and DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim #1811169).

5 Reconstitution from cDNA can be performed as follows:

 LLC-MK2, a cell line derived from monkey kidney, is cultured in a 24-well to 6-well plastic plate or in a 100-mm Petri dish in minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin) to be 70 to 80% confluent. Cells are then infected, for instance, at 2 PFU/cell with recombinant vaccinia virus vTF7-3 expressing T7 polymerase, which virus has been inactivated by a 20-minute UV exposure in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986); and Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)). The amount of psoralen and the duration of UV exposure can be optimized. One hour after infection, cells are transfected by, for example, lipofection using Superfect (QIAGEN) with 2 to 60 µg, or more preferably 3 to 5 µg of the above recombinant Sendai virus cDNA together with expression plasmids for virus proteins (24-0.5 µg pGEM-N, 12-0.25 µg pGEM-P, and 24-0.5 µg pGEM-L, or more preferably 1 µg pGEM-N, 0.5 µg pGEM-P, and 1 µg pGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) that function in trans and are required for producing a full length Sendai virus genome. The transfected cells are cultured in serum free MEM containing, if desired, 100 µg/ml rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC) (Sigma), preferably 40 µg/ml AraC, so that the drug concentration is adjusted to be optimal to minimize the cytotoxicity of the vaccinia virus and maximize the recovery of the virus (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)). Cells are cultured for 48 to 72 hr after transfection, then collected and lysed through three cycles of freeze-thawing. The cell lysates are transfected into LLC-MK2 cells, and after a 3- to 7-day culture the culture medium is collected. To reconstitute a virus vector lacking a gene encoding an envelope protein that is incapable of replication, the vector may be transfected into LLC-MK2 cells expressing the envelope protein, or co-transfected with an expression plasmid for the envelope protein. Alternatively,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

transfected cells can be overlaid and cultured on LLC-MK2 cells expressing the envelope protein to propagate a deletion virus vector (see International Application Numbers PCT/JP00/03194 and PCT/JP00/03195). The virus titer of the culture supernatant can be
5 determined by measuring hemagglutinin activity (HA). The HA may be determined by the "endo-point dilution method" (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)). The obtained virus stock can be stored at -80°C.

According to the present invention, host cells are not limited
10 to any special type of cells as long as the virus vector can be reconstituted in the cells. Host cells may include LLC-MK2 cells; CV-1 cells derived from monkey kidney; cultured cell lines, such as, BHK cells derived from hamster kidney; and human-derived cells. Furthermore, to obtain a large quantity of Sendai virus vector,
15 embryonated chicken eggs may be infected with virus vectors obtained from the above host cells and the vectors can be amplified. The method of producing virus vectors using chicken eggs is well established (Advanced protocols in neuroscience study III, Molecular physiology in neuroscience., Ed. by Nakanishi et al., Kouseisha, Osaka, 153-172
20 (1993)). For example, more specifically, fertilized eggs are incubated for 9 to 12 days at 37 to 38°C in an incubator to grow the embryos. Virus vectors are inoculated into the allantoic cavity, and eggs are further incubated for several days to propagate the vectors. Conditions like duration of incubation may vary and depend upon the
25 type of recombinant Sendai virus used. Then, allantoic fluids containing viruses are recovered. The Sendai virus vector is separated and purified from the allantoic fluid sample according via a standard method (Tashiro, M., Protocols in virus experiments., Ed. by Nagai and Ishihama, MEDICAL VIEW, 68-73 (1995)).

30 To prepare a deletion virus vector, for example, two different virus vectors with genomes lacking different envelope gene, respectively, are transfected into a cell. As a result, envelope proteins encoded by the deleted genes are supplied through the expression from one of the vectors, and this mutual complementation
35 permits the generation of infective virus particles that can replicate and propagate. Thus, two or more of the virus vectors of the present

THIS PAGE BLANK (USPTO)

invention may be simultaneously inoculated in combination that complements each other and produces a mixture of each envelope deletion virus vector at a low cost and on a large scale. Because these viruses lacking an envelope gene have a smaller genome, they allow insertion of a longer foreign gene compared to those without deletion. In addition, the co-infecting ability of these intrinsically non-infective viruses can be hardly retained after dilution outside the cell; which means that such viruses are sterilized outside the cell and are less harmful to the environment.

Gene therapy can be conducted by preparing a viral vector using, as a foreign gene, a gene suitable for the treatment of a disease and then administering the vector. The viral vector of the present invention can be used in gene therapy to express a foreign gene for which a therapeutic effect is expected or an endogenous gene whose *in vivo* expression is impaired in a patient. Expression of the gene may follow either direct administration or indirect (*ex vivo*) administration of the viral vector. There are no limitations on any specific type of foreign gene, as it may include not only nucleic acids encoding proteins but also nucleic acids which do not encode any proteins (e.g., antisense or ribozyme).

The Paramyxovirus vector of the present invention can be formulated as a composition together with a desired pharmaceutically acceptable carrier. Herein, the phrase "pharmaceutically acceptable carrier" is defined as materials that can be administered with a vector and does not inhibit gene transfer achieved by the vector. For instance, the Paramyxovirus vector of the invention may be appropriately diluted with saline, phosphate buffered saline (PBS), etc. to make a composition. If the Paramyxovirus vector of the invention is propagated in chicken eggs, the composition may contain allantoic fluids. Also, the composition may contain carriers or media such as deionized water or 5% dextrose aqueous solution. It may further contain stabilizers, and antibiotics, etc.

A foreign gene carried by the Paramyxovirus vector that is obtained according to the above-described method can be expressed in skeletal muscle by transferring the Paramyxovirus vector or a composition comprising the vector into the skeletal muscle.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Moreover, prior to the administration of the virus vector, bupivacaine, which is known to enhance the expression of transgenes by inducing muscle regeneration, may be administered.

According to the present invention, there is no limitation on the type of gene to be transferred using Paramyxovirus of the present invention. Such genes may encode naturally occurring proteins or artificial proteins. Naturally occurring proteins include, for example, hormones, cytokines, growth factors, receptors, enzymes, and peptides. Such proteins can be secretory proteins, transmembrane proteins, cytoplasmic proteins, nuclear proteins, etc. Artificial proteins include, for example, fusion proteins, such as chimeric toxin; dominant negative proteins (including, soluble molecules of receptors and membrane-bound dominant negative receptors); deficient-type cell-adhesion molecules; and cell-surface molecules. Furthermore, secretory signal, membrane localization signal, or nuclear translocation signal may be added to such proteins. A gene to be introduced may be a gene which is not originally expressed in skeletal muscle. Alternatively, a gene which is normally expressed in skeletal muscle can be introduced for over-expression. It is also possible to suppress the functions of an undesirable gene expressed in skeletal muscle by introducing an antisense RNA molecule, or a ribozyme that cleaves RNA.

The vector of the present invention can be applied to gene therapy for various diseases. Such gene therapy can be carried out, for example, to compensate for the expression defect in cells due to gene deficiency, to confer a new function by introducing a foreign gene into cells, or to suppress an undesirable activity in cells by introducing a gene that suppresses the activity of a certain gene.

Examples of diseases to be treated by gene therapy include muscular dystrophy; myositis; myopathy; and myopathy and cardiomyopathy following myocardial infarction. Examples of genes effective for the treatment of muscular dystrophy include dystrophin and IGF-I; those for myositis, IGF-I and FGF; and those for myopathy, IL-10, IL-12, and IL-6.

A preferable example of a gene that is introduced by the Paramyxovirus of the present invention includes a gene encoding an

THIS PAGE BLANK (USPTO)

insulin-like growth factor. As a result, a significant increase in regenerating myofibers and splitting myofibers (they indicate hypertrophy), as well as an increase in the total number of myofibers can be expected. Thus, Paramyxovirus into which a gene that encodes an insulin-like growth factor has been introduced is expected to be applicable for the treatment of neuromuscular disorders. Examples of neuromuscular disorders include nerve fiber breakage caused by injury, amyotrophic lateral sclerosis, and spinal amyotrophy.

Gene therapy can be carried out by administering a composition containing the Paramyxovirus vector *in vivo*, either intramuscularly or extramuscularly, and expressing the foreign gene in skeletal muscle. In addition, it may also be administered *ex vivo*. Methods for introducing the vector into skeletal muscle include methods wherein the vector is introduced transcutaneously and methods wherein the vector is directly introduced by incision of the skin. When introducing the vector, one should be careful not to damage the epimysium.

The Paramyxoviral vector is administered into skeletal muscle at a sufficient dose that ensures the introduction of an effective amount of the vector into skeletal muscle. The term "effective amount," as employed herein refers to an amount that ensures the introduction of the gene into skeletal muscle by the method of the present invention to produce a desired therapeutic or preventive effect (at least in part). The administration of an effective amount of the Paramyxoviral vector of the present invention comprising a desired gene induces alterations in the phenotypes of the cells where the vector has been introduced and/or the surrounding skeletal muscle. Preferably, the administration of an effective amount of the vector of the present invention comprising the desired gene to skeletal muscle leads to the introduction of the gene into a significant number of cells in the skeletal muscle as well as to the induction of alterations in the phenotypes of the cells. The phrase "a significant number of cells" means that the gene has been introduced via the vector of the present invention into at least about 0.1%, preferably about 1% or more, more preferably about 5% or more, still more preferably about 10% or more, most preferably about 20% or more of target skeletal

THIS PAGE BLANK (USPTO)

muscle at the administration site.

The achievement of gene transfer into cells can be confirmed via assay methods known to those skilled in the art. For example, the transcript of a gene can be detected, by Northern hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), or RNA protection assay. The detection by Northern hybridization, RT-PCR, etc. can also be carried out *in situ*. The detection of the translation product can be carried out using antibody by Western blotting, immunoprecipitation, RIA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), pull-down assay, etc. To easily detect the achievement of gene transfer, the protein to be expressed can be tagged or a reporter gene can be inserted so as to ensure its expression. The reporter gene includes, but is not limited to, genes encoding β -galactosidase, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), alkaline phosphatase, and green fluorescent protein (GFP).

The dose of the vector and the route of administration can be appropriately determined by those skilled in the art, and may vary depending on the disease, body weight, age, sex, and symptom(s) of the patient, the purpose of administration, the kind of transgene, etc. The concentration of the vector (with pharmaceutically acceptable carriers) may be preferably within the range of approximately 10^5 PFU/ml to 10^{11} PFU/ml, more preferably approximately 10^7 PFU/ml to 10^9 PFU/ml, and most preferably approximately 1×10^8 PFU/ml to 1×10^9 PFU/ml.

The composition of the present invention comprising the virus vector may be administered into subjects, including all mammalian animals, such as humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, and dogs.

30 Brief Description of the Drawings

Fig. 1 depicts a photograph and graph showing *in vitro* expression of hIGF-I. (A) The photograph showing the expression of hIGF-I in the culture supernatant of virus infected L6 cells. Samples from culture supernatant with following conditions were analyzed by Western blotting (1= virus free, 2= LacZ/SeV (moi=0.1, 3 days) 3= IGF-I/SeV (moi=0.1, 3 days), 4= IGF-I/SeV (moi=0.1, 4 days). (B) The

THIS PAGE BLANK (USPTO)

graph showing time- and moi-dependent expression of hIGF-I derived from hIGF-I/SeV infected L6 cells. Supernatants from cells infected with different moi were taken at different time points, and assayed for hIGF-I quantities using ELISA kit.

5 Fig. 2 depicts photographs showing myogenic differentiation and hypertrophy of L6 cells enhanced by SeV-mediated hIGF-I.

Control cells cultured in serum-free media (differentiation media) for 4 days. The virus infected cells were infected at either moi=0.05 or 0.2, and cultured in serum-free media for 4 days. After
10 fixation, the myotubes were treated with monoclonal antibody against the myosin heavy chain embryonic subunit (MAb BF-45) and other cells were subjected to nuclear staining. The viral infected cells shows moderate myotube hypertrophy at moi=0.05 and much more pronounced myotube hypertrophy at moi=0.2 than those cultured under serum free
15 condition alone. Nuclear organization was observed in the viral infected cells, which was grouped in the middle of the myofibers.

Fig. 3 depicts photographs showing transducibility of SeV to skeletal muscle *in vivo*.

With/without pre-treatment with myonecrotic agent
20 (bupivacaine), 200 µl of recombinant SeV (5×10^7 PFU) carrying the LacZ reporter gene (LacZ/SeV) was injected in the tibialis anterior muscle of mature rat. After indicated days as follows, the muscle was excised and stained for the β -galactosidase activity; A and B: bupivacaine (7 days), C and D: bupivacaine (14 days), E and F:
25 bupivacaine (30 days), G and H: no bupivacaine (7 days), I and J: no bupivacaine (14 days), and K and L :no bupivacaine (30 days).

Fig. 4 depicts a photograph showing the expression of hIGF-I in the tibialis anterior muscle 7 days after virus injection analyzed by Western blotting with anti-hIGF-I antibody. 200 µl each of either
30 LacZ/SeV (2×10^8 PFU) or hIGF-I/SeV (2×10^8 PFU) was injected in the tibialis anterior muscle. 7 Days later, 300 µl of tissue extraction solution was obtained from 100 µg of excised frozen muscle tissue. Proteins in 50 µl of the extraction solution (corresponding to 16.7 µg tissue) were precipitated with cold acetone, and then were
35 subjected to Western blot analysis with anti-hIGF-I antibody. (M: marker proteins, 1: no-treatment, 2: LacZ/SeV (#1 animal), 3: LacZ/SeV

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(#2 animal), 4: hIGF-I/SeV (#3 animal), 5: hIGF-I/SeV (#4 animal)).

Fig. 5 depicts photographs showing the expression of hIGF-I in the tibialis anterior muscle 7 days after virus injection. Regeneration of the tibialis anterior muscle. 200 μ l each of LacZ/SeV (2 x 10⁸ PFU) and hIGF-I/SeV (2 x 10⁸ PFU) was injected in the right- or left-tibialis anterior muscles, respectively. The excised muscle transverse sections were treated with hematoxylin-eosin (HE) (a, d, and g), with acid phosphatase to detect macrophage (b, e, and h), and with BF-45 (c, f, and i). Macrophage and BF-45 positive cells are shown with white and black arrowheads, respectively.

Fig. 6 depicts a graph showing the expression of hIGF-I in the tibialis anterior muscle 7 days after virus injection. The number of myofiber expressing embryonic MyHC. The total number of positive embryonic MyHC cells was counted (n=4), and the results are expressed as the mean \pm SD (n=4). The single asterisk denotes P<0.01 for paired comparisons (Student's t test).

Fig. 7 depicts photographs showing the regeneration of the tibialis anterior muscle 14 days after virus injection. 200 μ l each of LacZ/SeV (2 x 10⁸ PFU) and hIGF-I/SeV (2 x 10⁸ PFU) was injected in the right- or left-tibialis anterior muscles, respectively. The transverse sections of excised muscle were treated with hematoxylin-eosin. (A: allantoic fluid only, B: IGF-I/SeV (left), C: LacZ/SeV (right)).

Fig. 8 depicts photographs showing the regeneration of the tibialis anterior muscle 30 days after virus injection. Almost no inflammatory reaction was seen in the section. IGF-I/SeV treated muscle showed splitting phenomena due to hypertrophy (Fig. 8a and b). Split positions are shown with arrowheads. The regeneration myofibers treated with LacZ/SeV returned nearly to normal (Fig. 8c).

Fig. 9 depicts a graph showing the regeneration of the tibialis anterior muscle 30 days after virus injection. Effect of hIGF-I expression on the number of myofibers (open bars) and number of splitting fibers (closed bars). The total number of fibers of the LacZ/SeV-treated tibialis anterior muscle of each animal in group 1 served as the control (the value defined as 1) for hIGF/SeV-treatment (the results expressed as relative values to the control) (open bars).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The average relative value ($n=4$) is plotted (\pm SD). Single asterisk denotes the $P<0.03$ for paired comparisons (Student's t test). The number of splitting fibers was counted, and the results are expressed as the mean \pm SD ($n=4$). Double asterisks denote the $P<0.01$ for paired
 5 comparisons (Student's t test).

Fig. 10 depicts a graph showing the comparison of gene introduction in mouse leg muscle (after 3 days). The titer was 4×10^7 CIU/head (dose: 100 μ l, administration: twice).

10 Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention will be explained in detail below with reference to Examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

15 [Example 1] Construction of Sendai virus vector

The human IGF-I open reading frame was amplified by PCR from a human cDNA library (Gibco BRL, Rockville, MD) with primers, 5'-ATCCGAATTCGCAATGGGAAAAATCAGCAGTC-3' (SEQ ID NO: 1) and 5'-ATCCGAATTCCTACATCCTGTAGTTCTTGTTCCTGC-3' (SEQ ID NO: 2), based
 20 on the DNA sequence of Accession number X00173 (Nature 306, 609-611 (1983)). The resulting PCR product was cloned at the *Eco*RI site of pBluescript II, and then was sequenced. The product with the correct sequence of hIGF-I gene was re-amplified with primers, containing SeV-specific transcriptional regulation signal sequences,
 25 5'-ATCCGCGGCCGCCAAAGTTCAGCAATGGGAAAAATCAGCAGTCTTC-3' (SEQ ID NO: 3) and 5'-ATCCGCGGCCGCGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCTA CATCCTGTAGTTCTTGTTCCTGC-3' (SEQ ID NO: 4), and was cloned to generate pIGF-I/SeV in the *Not*I site of the parental pSeV18+b(+), which was constructed to prepare exact SeV full-length antigenomic plus sense
 30 RNA of 15402 nucleotide. The resulting pIGF-I/SeV was transfected into LLCMK2 cells infected with vaccinia virus vTF7-3, expressing T7 polymerase. T7-driven full-length recombinant IGF-I/SeV RNA genome was encapsulated with N, P, and L proteins, which were dried from respective cotransfected plasmids. After a 40-hr incubation,
 35 the transfected cells were injected into embryonated chicken eggs to amplify the recovered virus.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[Example 2] *In vitro* hIGF-I expression

IGF-I has been shown to be closely related to proliferation, differentiation, and hypertrophy in both rats (J. Biol. Chem. 272, 6653-6662 (1997); J. Cell. Biol. 135, 431-440 (1996)) and mice (J. Biol. Chem. 264, 13810-13817 (1989)) cell lines. The present inventors investigated whether recombinant human IGF-I can induce morphological changes of L6 cells (neonatal rat myoblast cell line) via SeV-mediated gene transfer. The newly constructed recombinant SeV harboring human IGF-I (hIGF-I) gene, designated as hIGF-I/SeV, and SeV encoding β -galactosidase (LacZ/SeV) were used for investigating the following facts : (1) IGF-I expression in supernatant (Western blotting analysis), (2) kinetics of IGF-I expression in supernatant (ELISA assay), and (3) morphological change of L6 cells.

In vitro study

Differentiation into myotube cells of L6 cells was suppressed by culturing them in DMEM medium with 20% FCS and penicillin/streptomycin. The cells were infected with virus in serum-free DMEM or without serum followed by culturing under differentiating conditions. For immunoblotting, 100 μ l of supernatant were concentrated to 10 μ l with 2 volumes of cold-acetone, were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a 15-25% resolving gel, and then were transferred to a polyvinylidene-difluoride membrane (DAIICHI PURE CHEMICALS, Tokyo). Primary antibody reaction was performed with anti-human IGF-I monoclonal antibody (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX), and horseradish peroxidase-labeled antibody was used for the second reaction. Complexes were visualized using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, UK). ELISA assay was conducted to measure the IGF-I level in the culture supernatant. The assay was basically performed following the manufacturer's recommendations (R&D systems, Minneapolis, MN).

As a result, (1) reaction bands with a molecular mass of 12-13 kDa were observed for the culture supernatants of L6 cells infected

THIS PAGE BLANK (USPTO)

with hIGF-I/SeV under the conditions of a multiplicity of 0.1 for 3 and 4 days (Fig. 1A, lanes 3, and 4). This protein specie was absent in LacZ/SeV infected supernatant. The result demonstrates that hIGF-I was produced from the recombinant SeV and was secreted into the culture supernatant.

(2) Fig. 1B shows the amount of IGF-I expressed in the L6 cell supernatant after viral infection. Under an infectious condition with a multiplicity of 0.05, 48 hr after infection the IGF-I concentration in the supernatant increased to 203 ng/ml without showing cytopathogenic effect (CPE) to the cells, and after 96 hr increased to 435 ng/ml. At a multiplicity of 0.5, 566 ng/ml and 935 ng/ml of IGF-I were secreted into the medium after 48 hr and 96 hr, respectively. Under an infectious condition with a multiplicity of 2.5, IGF-I concentration of 39 ng/ml and 463 ng/ml were detected after 12 hr and 24 hr, respectively. No IGF-I could be observed in the LacZ/SeV infected supernatant. These results show that the gene products were secreted into the culture supernatant via the SeV-mediated gene transfer.

(3) L6 cell line is known to express the IGF-I receptor instead of IGF-I, and therefore is responsive to exogenous IGF-I, which induces hypertrophy (J. Cell. Biol. 135, 431-448 (1996)). The ability of recombinant IGF-I to induce differentiation of L6 was examined. L6 cells were grown in medium containing 20% FCS, and virus-mediated gene transfer was conducted at 80% confluency, and the medium was substituted with serum-free medium or serum-free medium with a definite concentration of hIGF-I protein. 500 µg/ml of bovine serum albumin was added to all samples to suppress adsorption of hormone to the cell surface. After four days, clear differences in cell morphology dependent on the virus infection multiplicity could be observed (Fig. 2). Generated myotubes were treated with myosin heavy chain (MyHC) antibody against the embryonic subunit (MAbBF45). The bound antibody was visualized with Alexa Flour™ 568 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate. Nuclei of the cells were visualized by propidium iodine staining. The cells cultured in the media containing hIGF-I at the concentrations of a multiplicity of 0.05 (Fig. 2A and B) and 0.2 (Fig. 2B and F) exhibited larger myotubes, multiple nuclear in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the middle of the myofibers, and hypertrophy (i.e., increase in size and width of the myotube) (Fig. 2A, B, E, and F), compared to cells cultured in both serum and hIGF-I free condition (Fig. 2D and H). Moreover, the morphological changes induced by the viral infection was consistent with that induced by the IGF-I protein (Fig. 2C and G). These results indicate that the efficacy of the recombinant hIGF-I from SeV was the same as that of the IGF-I protein, and that the recombinant hIGF-I also shows biological function *in vitro* and induced myogenesis of the neonatal rat myoblast L6 cells.

[Example 3] *In vivo* LacZ reporter gene expression

Sprague-Dawley rats (male, 6 week old, 160-180 g) were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (50 mg/kg). The hind limbs were shaved and scrubbed with ethanol, and 1.5-cm skin incisions were made to expose the tibialis anterior muscles. For LacZ reporter gene transfer study, 200 μ l of LacZ /SeV (5×10^7 PFU) were injected into the mid belly of the left tibialis anterior muscle. Transgene expression was observed by X-gal staining. For bupivacaine treated animals, 3 days prior to vector injection, 200 μ l of 0.5% bupivacaine solution was injected into the tibialis anterior muscle .

As a result, one week after LacZ/SeV injection, the muscle tissue pre-treated with bupivacaine showed a high level X-gal staining (Fig. 3A and B) compared with the untreated muscle (Fig. 3G and H). Some X-gal positive fibers were observed among comparatively small myofibers around necrotic fibers, and infiltrating cells of neutrophils and macrophages in bupivacaine pretreated muscle (Fig. 3B). The small myofibers are considered to be regenerated immature fibers, which were induced by the intramuscular injection of bupivacaine and/or by viral injection in the tibialis anterior muscle of adult rats. Vitadello et al. (Hum. Gene Ther. 5, 11-18 (1994)) demonstrated that, 3 days after bupivacaine treatment, muscle show mononucleated cells and small myotubes which can be stained with anti MyHC monoclonal antibody (BF-45), and that the enzymatic activity expressed by the transfection of naked DNA is higher after 3 days than 1 or 7 days after the injury. The small and positive fibers to

THIS PAGE BLANK (USPTO)

which SeV could introduce the LacZ gene were considered to be mitotically active myoblasts or immature myotubes emerging during skeletal muscle maturation. In non bupivacaine-treated animals, the necrotic myofiber area induced by viral infection was much smaller than that induced in bupivacaine and virus treated animals. Although the number of positive fibers were less than that in the bupivacaine treated ones, X-gal labeled myofibers could be also observed in the non bupivacaine-treated myofibers (Fig. 3H). The cells around the transduced myofibers had no central nucleus and also were larger in size than the regenerated myofibers shown in Fig. 3B, indicating that these cells may be mature myofibers. Taken together, the transduced myofibers may be mature myofibers. Therefore, SeV could introduce the genes encoding proteins into rat mature myofibers. The expression of X-gal could be also observed two weeks after the viral injection. The profiles of positive fibers in bupivacaine-treated and non treated animals (Fig. 3C, D, I, and J) were consistent with that of the samples after 7 days described above, though the number of positive fibers was decreased. 30 days after viral injection, X-gal labeled fibers could be observed only in bupivacaine-treated animals (Fig. 3E and F). On the other hand, X-gal labeled fibers could not be observed in myofibers but in interstitial cells of bupivacaine-untreated animals (Fig. 3K and L). These results demonstrates that SeV is infectious to myoblasts during cell division, and post-mitotic immature as well as mature myotubes.

25

[Example 4] *In vivo* IGF-I gene transfer

Since the high level hIGF-I expression *in vitro* and the introduction of the LacZ gene into the regenerated and mature myofibers by SeV-mediated gene transfer *in vivo* was confirmed, as the next step, the present inventors determined whether hIGF-I introduced into rat skeletal muscle via SeV-mediated gene transfer could promote the growth of rat skeletal muscle, such as increase in the number of myofibers and myotube hypertrophy. First the expression of hIGF-I in the tibialis anterior muscle was determined by Western blot analysis. 200 μ l of allantoic fluid, viral solvent containing hIGF-I/SeV with 2×10^8 PFU (a four times higher PFU than that in

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

previous experiments), and LacZ/SeV with 2×10^8 PFU, respectively, were injected into the tibialis anterior muscle of adult Sprague-Dawley rats.

1 week, 2 weeks, and 30 days after injections, the animals were euthanized by a lethal dose of sodium pentobarbital. The tibialis anterior muscles were excised and then subjected to histological staining and Western blotting. Human IGF-I in the rat muscles was assayed by Western blotting. 100 μ g of muscle tissue was frozen in liquid nitrogen, and then milled with a mortar and pestle. 500 μ l of chilled 1 M acetic acid was added to each tissue. The mixture was homogenized and then left standing on ice for 2hr. After centrifugation at $3,000 \times g$ for 15 min, the supernatant was collected. Fresh 1 M acetic acid was added to the precipitate for reextraction. Then, the two supernatants were combined, frozen at -70°C , lyophilized, and suspended in 300 μ l of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8). After concentrating the solution from 50 μ l to 10 μ l, the solution was subjected to Western blotting.

For immunohistochemical staining of regenerating myofibers, excised tibialis anterior muscle that was immediately frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen was used. The obtained sample was cut to 10 μ m thick sections, and were placed on lysine coated slides. The immunostaining of regenerating myofibers was conducted by primary antibody reaction treatment of the sections with mouse anti-embryonic myosin heavy chain monoclonal antibody (BF-45); incubating with secondary biotinylated anti-mouse IgG (1:100; Vector, Burlingame, CA) for 1 hr at room temperature; and then incubating with streptoavidin-biotin complex (1:200 dilution; Vector, Burlingame, CA) for 1 hr at room temperature for coloring. The avidin-biotin complex was visualized with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.01% hydrogen peroxide. The sections were then counterstained with eosin. The monoclonal antibody BF-45 was developed by Dr. S. Schiaffino (Hum. Gene Ther. 5, 11-18 (1994)), Padova, Italy, and was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). To assess the regenerating effect of hIGF-I, the number of anti-BF-45 immunopositive fibers were counted 7 days after the injection. In

THIS PAGE BLANK (USPTO)

addition, to evaluate the hypertrophic effect of hIGF-I, the number of splitting fibers of muscles were counted after 30 days.

As a result, one week after injection, the samples of the tibialis anterior muscle treated with IGF-I/SeV demonstrated a band of a molecular mass of approximately 8-9 kDa with anti-hIGF-I antibody. This value (Fig. 4A, lanes 4 and 5) is not consistent with that observed in the culture supernatant (Fig. 1A). The precursor of hIGF-I, observed in the *in vitro* experiment seem to convert *in vivo* due to protease cleavage to the mature form of hIGF-I reported to be 7.7 kDa (Bio Science, Cytokinin growth factor, Yodosya, pp.104-105).

Next, the effect of hIGF-I on normal mature muscle was examined. Adult rats (6 week old) received injection of (1) hIGF-I/SeV (2×10^8 PFU) into the left tibialis anterior muscle and LacZ/SeV (2×10^8 PFU) into the right tibialis anterior muscle (group 1); (2) hIGF-I/SeV (2×10^8 PFU) into the left tibialis anterior muscle alone (n=12) (group 2); (3) LacZ/SeV (2×10^8 PFU) into the left tibialis anterior muscle alone (n=12) (group 3); or (4) allantoic fluid alone into both tibialis anterior muscles (n=3) (group 4).

Seven days after the viral injection of both IGF/SeV and LacZ/SeV in group 1, fiber resolution due to massive necrosis; edema formation in the perimysium; and infiltration of numerous mononuclear phagocytotic macrophages, lymphocytes, and some neutrophils in the extracellular space were detected in the myofibers at the administration site of the remaining sections (Fig. 5d and g). The remaining normal sized myofibers within the necrotic area were invaded by numerous acid phosphatase-positive macrophages (Fig. 5c and h). However, no damage, just appearance of a very small amount of macrophages, could be observed in the muscle treated with the allantoic fluid alone (Fig. 5a and b). Taken together, SeV introduction causes damage and induces necrosis in the infected muscle, followed by the infiltration of macrophages, lymphocytes, and so on, which remove the necrotic muscle. Phagocytosis, however, is a very important event for muscle regeneration, since the regeneration is inhibited by persisting necrotic tissue. After phagocytosis, muscle precursor cells or satellite cells are activated and proliferation of myoblast is known to start (Jikkenigaku, Yodosya, 444-448 (2000.3)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Moreover, three days after the bupivacaine treatment, the muscle is reported to be composed of mononucleated cells and small myotubes positive for anti-MyHC monoclonal antibody (BF-45), which cells are indices of regenerating myofibers (Hum. Gene Ther. 5, 11-18 (1994)).

5 Very small round myofibers with central nuclei were observed in infiltrating macrophages. Therefore, immunoreaction of these cells against BF-45 was examined. A significantly larger number of BF-45-positive regenerated myofibers was observed in the left tibialis anterior muscle that received hIGF-I/SeV injection (Fig.

10 5f) in comparison to the right tibialis anterior muscle which received the LacZ/SeV injection (Fig. 5i). As shown in Fig. 6, the average numbers of BF-45 immunopositive fibers in group 1 animals were 446 (n=4) and 1,722 (n=4) for LacZ/SeV (right) and IGF-I/SeV (left), respectively. No BF-45 immunopositive myofiber was detected in the

15 animals treated with allantoic fluid (group 4, Fig. 5c).

14 days after virus vector administration, the number of macrophages dramatically decreased in both hIGF-I/SeV and LacZ/SeV treated muscles (Fig. 7) (groups 1, 2, and 3). In the LacZ/SeV treated muscle, medium myofibers with the same size having central nuclei

20 increased (Fig. 7C). On the other hand, in the IGF-I/SeV treated muscle, a few necrotic fibers remained with scattered macrophages (data not shown) and various sized myofibers including small sized fibers could be observed (Fig. 7B), which indicate continuous formation of new fibers. No infiltration of fibroblasts and

25 consequent collagenization were observed in either the hIGF-I/SeV or LacZ/SeV treated muscles. The space occupied by interstitial cells, mainly macrophages, 7 days after viral induction was found to be almost completely replaced by the regenerated myofibers (Fig. 7B and C).

30 days after virus vector administration, the size of muscle

30 returned nearly to normal and evenly in the treated muscles of the group 1 animals (Fig. 8 and 9). In the hIGF-I/SeV treated muscles of the group 1 animals, cluster of medium sized myofibers was interspersed among the normal sized myofibers (data not shown). The total number of myofibers in the hIGF-I/SeV treated muscle of the

35 group 1 animals was 17% higher than that in the LacZ/SeV treated muscle ($P < 0.03$, $n=4$) (Fig. 9). In groups 3 and 4, no statistical significant

THIS PAGE BLANK (USPTO)

difference in the numbers of fibers existed between the right and left muscles (data not shown). Furthermore, the numbers of splitting fibers, which is a common result of hypertrophy, increased. The average number of splitting fibers in hIGF-I/SeV treated muscles of group 1 animals was 6.1 times as much as those in LacZ/SeV treated muscles (Fig. 9). These data indicate that this splitting phenomenon might have induced the increase in the total number of myofibers in muscles treated with hIGF-I/SeV.

The effect of IGF-I on mature skeletal muscles have been reported several times. Adans and McCue (J. Appl. Physiol. 84 (5), 1716-1722 (1998)) investigated the effect of local infusion of IGF-I protein into normal rat tibialis anterior muscle. A significant increase in muscle weight, total protein, and total DNA could be observed in the IGF-I injected muscle. However, they failed to report the increase in the total number of myofibers. Barton-Davis et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15603-15607 (1998)) transferred the IGF-I gene into aged rats using an AAV vector. Although fiber regeneration and muscle hypertrophy could be observed, no increase in the number of regenerated myofiber could be detected. In the study by the present inventors, a significant increase in the number of regenerated fibers, hypertrophied fibers, and total fibers was observed in normal adult muscle due to the effect of overexpressed hIGF-I. The observed new myofiber formation may be a result of the high expression level of IGF-I achieved by the SeV vector.

[Example 5] Comparison of Gene Expression of Purified LacZ-SeV/dF and LacZ-SeV in mouse leg muscle

Gene expression of additive Sendai virus vector derived from developing chicken egg chorio-allantoic fluid (LacZ-SeV) and purified F-deficient type LacZ Sendai virus vector derived from LLC/MK2/F/Ad cells (LacZ-SeV/dF) injected into leg muscle (dosage: 4×10^7 CIU/head) was compared by intramuscular administration using BALB/c mice.

18 six-week-old male BALB/c mice (Charles River Japan, Inc.) were used in the experiment. The animals were acquired at the age of six weeks, and after a two-day acclimation period, the animals were divided into three groups each consisting of six animals: (1)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

untreated group; (2) LacZ-SeV (4×10^7 CIU/head) group; and (3) LacZ-SeV/dF (4×10^7 CIU/head) group. Each viral solution was administered under ether anesthesia at a dosage of 2×10^8 CIU/ml, 100 μ l per cite at two cites for each animal on both sides of the tibialis anterior muscle using a 29G syringe while immobilizing the legs of the animals. The muscles were rubbed for about 1 minute after the administration.

Three days after the administration, the animals were anatomized under ether anesthesia, and the leg muscle on the administered (right) side were sampled and used for LacZ assay.

Quantification of LacZ was carried out as described below. First, leg muscle was excised (2.0 ml microtube) and frozen with liquid nitrogen. Next, 500 μ l of Lysis solution was added (muscle weight: approx. 500 mg), and the muscle was homogenized (MultiPro) while cooling on ice. The homogenate was centrifuged (15000 rpm x 15 min), and 10 μ l of supernatant was sampled into an assay tube. Then, 70 μ l of Reaction Buffer A (100 μ l kit containing 1 μ l of Galacton-Plus and 99 μ l of Reaction Buffer; Galacton-Light-Plus, TROPIX, Cat. No. 250065) was added and left standing for 30-60 minutes at room temperature while blocking from light. 100 μ l of Accelerator was added to measure with luminometer.

By comparing the gene expression (quantitative) in leg muscle 3 days after administration, LacZ-SeV/dF and LacZ-SeV clearly exhibited stronger expression as compared with the untreated group (Fig. 10). When LacZ-SeV/dF and LacZ-SeV were compared, although there was some variation, the expression was determined to be nearly equal. This is believed to be due to the low influence of secondary infection in the muscle. For the treatment of muscle diseases by gene therapy, equal effects can be expected by the use of F-deficient type and the additive type viruses since no differences in gene expression were detected between the two.

Industrial Applicability

The present invention enabled introduction of genes into skeletal muscle with extremely high efficiency using Paramyxovirus vector. As a result, the present invention provides a basic technique

THIS PAGE BLANK (USPTO)

for gene therapy targeting skeletal muscle, particularly for systemic diseases and neuromuscular disorders. According to another aspect of the present invention, introduction into skeletal muscle of a gene encoding an insulin-like growth factor using the Paramyxovirus vector
5 of the present invention is expected to be applicable for the treatment of atrophy, reduction, and denaturation of myofibers. These findings are expected to potentiate current treatment methods for neuromuscular disorders.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

CLAIMS

1. A method for introducing a foreign gene into skeletal muscle, wherein said method comprises the step of administering a
5 Paramyxovirus vector inserted with the foreign gene into skeletal muscle.

2. The method according to claim 1, wherein the Paramyxovirus is Sendai virus.

3. The method according to claim 1 or 2, wherein the foreign gene
10 is a therapeutic gene.

4. The method according to claim 1 or 2, wherein the foreign gene is a gene that encodes an insulin-like growth factor.

5. A Paramyxovirus vector inserted with a foreign gene which is used for introducing the foreign gene into skeletal muscle.

6. The vector according to claim 5, wherein the Paramyxovirus
15 is Sendai virus.

7. The vector according to claim 5 or 6, wherein the foreign gene is a therapeutic gene.

8. The vector according to claim 5 or 6, wherein the foreign gene
20 encodes an insulin-like growth factor.

9. A composition for introducing a foreign gene into skeletal muscle which comprises a Paramyxovirus vector inserted with the foreign gene.

10. The composition according to claim 9, wherein the
25 Paramyxovirus is Sendai virus.

11. The composition according to claim 9 or 10, wherein the foreign gene is a therapeutic gene.

12. The composition according to claim 9 or 10, wherein the foreign gene encodes an insulin-like growth factor.

13. The composition according to claim 12 which is used for
30 increasing regenerating myofibers and/or splitting myofibers in mammal.

14. The composition according to claim 12 which is used for the treatment of neuromuscular disorders.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ABSTRACT

Whether recombinant Sendai virus (SeV) vector can be used for transporting genes into skeletal muscle was examined using LacZ
5 reporter gene and insulin-like growth factor gene. As a result, transgene expression continued at longest for 1 month after the injection. Compared with control, the transduction of the insulin-like growth factor gene caused a significant increase in regenerated fibers and splitting myofibers, i.e., an index of
10 hypertrophy. Furthermore, the total number of myofibers increased by the gene. Thus, Paramyxovirus vectors, including Sendai virus, were shown to achieve a high-level expression of transgenes in skeletal muscle; and the high potential of the transduction of an insulin-like growth factor gene using a Paramyxovirus vector in treating
15 neuromuscular disorders was indicated.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)